



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**EVOLUČNÍ INŽENÝRSTVÍ PHA PRODUKUJÍCÍ BAKTERIE
HALOMONAS HALOPHILA**

EVOLUTIONARY ENGINEERING OF PHA PRODUCING BACTERIUM HALOMONAS HALOPHILA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Terézia Ikrényiová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1422/2018
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Terézia Ikrényiová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Evoluční inženýrství PHA produkující bakterie Halomonas halophila

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Adaptace H. halophila vůči vybraným stresorům
3. Charakterizace biotechnologického potenciálu adaptovaných kmenů

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Terézia Ikrényiová
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Bakalárska práca sa zaoberá v teoretickej časti evolučným inžinierstvom PHA produkujúcich baktérií, princípom produkcie PHA a riešením nevýhod tejto výroby, ale taktiež aj využitím týchto biopolymérov. V experimentálnej časti je opísaná produkcia polyhydroxyalkanoátov baktériou *Halomonas halophila* s cieľom získať čo najvyšší obsah 3-hydroxyvalerátu (3HV) vo vzniknutom kopolymére. Ten bol dosiahnutý pridaním kyseliny valérovej ako prekursoru 3HV pre bakteriálne bunky. Bolo zistené, že vyššie koncentrácie ako 3 g/l nevedú k produkcii dostatočnej koncentrácie PHA. Pri veľmi nízkych koncentráciách kyseliny valérovej bol obsah 3HV v PHA nízky. Vyhovujúca koncentrácia tohto prekursoru, pri ktorej bunky vykazujú dostatočnú produkciu PHA, je 3 g/l. Taktiež bolo zistené, že kyselina by mala byť pridaná až po 24 hodinách kultivácie v minerálnom produkčnom médiu. Práca sa zaoberá aj porovnaním pôvodných kmeňov baktérie *Halomonas halophila* s kmeňmi, ktoré boli adaptované na kyselinu valérovú predstavujúcu stresový faktor pre baktérie. Bol potvrdený predpoklad, že u adaptovaných kmeňov baktérií dochádza k lepšej využitiu kyseliny valérovej a väčšej inkorporácii do kopolyméru, ako u pôvodných kmeňov.

Abstract

This bachelor thesis deals with evolutionary engineering of PHA producing bacteria, the principle of PHA production and solution of this production's disadvantages, but also applications of these biopolymers in the theoretical part. The production of polyhydroxyalkanoates by bacteria *Halomonas halophila*, which is focused on gaining the maximum amount of 3-hydroxyvalerate in formed copolymer, is described in the experimental part. The precursor valeric acid was added to bacteria due to gain the amount of 3HV. It was found that the concentrations over 3 g/l aren't usable for production sufficient concentration of PHA. The very low concentrations of valeric acid led to low amount of 3HV in PHA. The available concentration of this precursor for production sufficient concentration of PHA by bacterial cell is 3 g/l. Moreover, it was found that the valeric acid should be added after 24 hours of cultivation in mineral production medium. The thesis is also centred on comparison the original bacterial strains of *Halomonas halophila* to strains, which were adapted on valeric acid as stress factor for bacteria. The assumption, that the adapted strains can better utilize valeric acid and the incorporation to copolymer of it is higher like the original strains, was affirmed.

Kľúčové slová

Evolučné inžinierstvo, adaptácia, polyhydroxyalkanoáty, *Halomonas halophila*, kopolymér poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), kyselina valérová.

Key words

Evolutionary engineering, adaptation, polyhydroxyalkanoates, *Halomonas halophila*, copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), valeric acid.

IKRÉNYIOVÁ, Terézia. *Evoluční inženýrství PHA produkující bakterie Halomonas halophila*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113538>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, a že som všetky použité zdroje správne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

Podpis študentky

PodĎakovanie:

Chcela by som poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce doc. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D. za všetky rady a pripomienky k písaniu nielen teoretickej časti práce, ale najmä za vedenie celej experimentálnej časti. Veľká vďaka patrí taktiež Ing. Ivane Nováčkovej za koordináciu mojej práce v laboratóriu a pomoc pri spracovaní výsledkov experimentov. Ďakujem aj všetkým ostatným, ktorí ma počas tohto obdobia podporovali.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	10
2.1	Evolučné inžinierstvo	10
2.1.1	História	10
2.1.2	Princíp.....	10
2.1.3	Stratégie evolučného inžinierstva	10
2.1.4	Využitie.....	11
2.2	Polyhydroxyalkanoáty	12
2.2.1	Štruktúra a vlastnosti kopolyméru P(3HB-co-3HV)	12
2.2.2	Porovnanie vlastností PHA s konvenčnými plastami	14
2.3	Produkcia PHA mikroorganizmami	14
2.3.1	Upstream.....	16
2.3.2	Downstream.....	16
2.4	Alternatívne riešenia nevýhod výroby PHA.....	17
2.4.1	Využitie odpadov a odpadných produktov	17
2.4.2	Neaseptický proces produkcie PHA	18
2.5	Bakteriálne druhy produkujúce PHA	19
2.5.1	<i>Halomonas halophila</i>	20
2.6	Využitie PHA	20
2.7	Likvidácia biodegradovateľných plastov.....	21
2.7.1	Biodegradácia plastov z PHA.....	21
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	24
3.1	Použité chemikálie, prístroje, mikroorganizmy	24
3.1.1	Použité chemikálie.....	24
3.1.2	Použité prístroje.....	24
3.1.3	Použité mikroorganizmy.....	25

3.2	Kultivácia mikroorganizmov	25
3.2.1	Kultivácia bakteriálnych inokúl.....	25
3.2.2	Kultivácia baktérií v minerálnom produkčnom médiu s využitím rôznych substrátov	25
3.3	Kultivácia baktérií s využitím kyseliny valérovej ako substrátu	27
3.3.1	Kultivácia baktérií s nižšou koncentráciou kyseliny valérovej	27
3.3.2	Kultivácia baktérií s pridaním kyseliny valérovej o rôznych koncentráciách po 24 hodinách kultivácie	27
3.4	Kultivácia baktérií pre porovnanie pôvodných kmeňov a adaptovaných kmeňov na kyselinu valérovú	27
3.4.1	Kultivácia baktérií na pevnom živnom médiu pre ich následnú izoláciu	28
3.4.2	Kultivácia izolovaných adaptovaných baktérií v minerálnom produkčnom médiu.....	28
3.4.3	Príprava kryoskúmaviek s adaptovanými baktériami.....	29
3.5	Stanovenie obsahu biomasy.....	29
3.5.1	Spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy	30
3.5.2	Gravimetrické stanovenie obsahu biomasy	30
3.6	Stanovenie obsahu PHA (a jednotlivých monomérov) v biomase	30
3.6.1	Príprava štandardov pre kalibračnú závislosť.....	30
3.6.2	Príprava vzoriek na ich analýzu plynovou chromatografiou.....	30
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	31
4.1	Kultivácia baktérií v minerálnom produkčnom médiu s využitím rôznych substrátov... ..	31
4.2	Kultivácia baktérií s využitím kyseliny valérovej ako substrátu	32
4.2.1	Kultivácia baktérií s nižšou koncentráciou kyseliny valérovej	32
4.2.2	Kultivácia baktérií s pridaním kyseliny valérovej o rôznych koncentráciách po 24 hodinách kultivácie	33
4.3	Porovnanie pôvodného kmeňa baktérií a adaptovaných kmeňov na kyselinu valérovú.....	34

5	ZÁVER	38
6	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	39
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	44
8	PRÍLOHY	45
8.1	Kalibrácia metódy pre stanovenie jednotlivých monomérov v kopolymére	45
8.2	Analýza biomasy na plynovom chromatografe s FID detekciou	47

1 ÚVOD

Plasty boli donedávna známe len ako výrobky z ropy a jej derivátov. Postupne sa stali náhradou tradičných materiálov a využívame ich dodnes. Túto zmenu na trhu ovplyvnila najmä nižšia cena, ale aj nižšia hmotnosť oproti kovom [1].

Dopyt po plastoch neustále narastá vďaka ich širokospektrálnemu využitiu v rôznych odvetviach priemyslu. Využitie vysokej teploty na zmenu tvaru a modifikačných činidiel na zmenu vlastností, poprípade štruktúry zabezpečuje ich rozmanitosť. Dôsledkom nadmernej produkcie sa nám objavujú problémy s ich likvidáciou, a taktiež ich negatívny vplyv na životné prostredie. Dostávajú sa doň cez vzduch, vodu, pôdu a potraviny. Pri skládkovaní odpadov alebo spaľovaní vznikajú skleníkové plyny (oxid uhličitý, oxid dusný, metán). Ich nadmerná koncentrácia v atmosfére spôsobuje ekologické problémy ako skleníkový efekt, ktorý vedie až ku globálnemu otepľovaniu. Ľudský organizmus je ovplyvňovaný najmä cez potraviny, do ktorých plasty uvoľňujú chemikálie (napr. styrén z polystyrénu).

Plasty sa prirodzene nerozkladajú (veľmi pomaly – niekoľko stoviek rokov), lebo dobre odolávajú viacerým vonkajším vplyvom prostredia. Patria medzi najhoršie recyklovateľné materiály, a preto sa neustále riešia otázky ich opätovného využitia alebo zneškodnenia.

Riešením je čiastočné nahradenie konvenčných plastov biodegradovateľnými. Medzi takéto plasty patria len tie, ktoré sa degradujú prirodzeným pôsobením mikroorganizmov (baktérií, húb, rias) vo vymedzenej časovej perióde bez uvoľňovania ekotoxických látok [2]. Už koncom rokov 80-tych boli známe biodegradovateľné plasty, ktoré boli vyrábané baktériami aj na Slovensku. Na STU v Bratislave doniesol zmienku o takýchto plastoch slovenský chemik profesor Blažej z Anglicka [3]. Biodegradovateľné polyméry vznikajú často dôsledkom deficitu rastových prvkov pri dostatočnej koncentrácii uhlíka v bunkách mikroorganizmov. Zabezpečujú úschovu uhlíka a energie, a tak sa mikroorganizmy chránia pred prípadnou zmenou podmienok prostredia (deficit potravy, stres). Medzi biodegradovateľné polyméry patria aj polyhydroxyalkanoáty [4]. Baktéria *Hamolonas halophila* je schopná syntetizovať tento prírodný polyester vo forme PHB. Vznik kopolyméru P(3HB-co-3HV) je možné doceliť s použitím vhodnej koncentrácie substrátu (valérátu) pri kultivácii. Kvôli inhibícii baktérií touto kyselinou je obsah 3HV je v kopolymére nižší, ako 3HB. Metódami evolučného inžinierstva sa dosiahne menší inhibičný účinok a prípadne vyššie zastúpenie 3HV v kopolymére (baktérie sa adaptujú na kyselinu valérovú). Aplikáciou stresového faktoru v laboratórnych podmienkach je možné doceliť, že adaptované organizmy budú odolnejšie voči stresu, a teda vhodnejšie pre priemyselnú využitie [5]. Ďalšie využitie evolučného inžinierstva je možnosť pomocou analýzy produktov mikroorganizmov identifikovať gény, ktoré podmieňujú vznik fenotypu [6].

Vlastnosti kopolyméru P(3HB-co-3HV) sa približujú konvenčným plastom a mohol by byť ich náhradou. Zmena pomeru 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalérátu umožňuje meniť vlastnosti daného kopolyméru podľa požiadaviek. Výskum v oblasti bioplastov neustále napreduje. K takmer každému konvenčnému plastu a zodpovedajúcej aplikácii existuje ako alternatívna náhrada bioplastový materiál. Väčšina veľkých nadnárodných firiem sa snaží obmedzovať podiel výrobkov z konvenčných plastov a nahradiť ich bioplastami (Danone,

Ikea, Samsung – výrobky alebo obaly z bioplastov, Lego – stavebnice z bioplastu, Coca-cola,) [4].

Opatrenia prichádzajú aj od Európskej Únie, ktorá zakázala bezplatné používanie jednorazových plastových tašiek (na jedného Slováka pripadá ročne 466 týchto tašiek, na Čecha okolo 300) [7].

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Evolučné inžinierstvo

Evolučné inžinierstvo umožňuje vhodným nastolením podmienok prostredia urýchľovať rast buniek mikroorganizmov a optimalizovať podobu metabolitov, ktoré ich organizmus vyprodukuje [8]. Dôsledkom toho môžeme získavať rôzne zlúčeniny, ktoré sa bez použitia evolučného inžinierstva aplikovaného na mikroorganizmy pripravujú obťažne.

2.1.1 História

Antonie van Leeuwenhoek, Louis Pasteur, Robert Koch a Charles Darwin boli prví, ktorí sa venovali experimentom s mikroorganizmami a položili tak základné princípy, neskôr využívané pre laboratórnu evolúciu. Riadená evolúcia je vo vedeckom ponímaní veľmi dôležitá pri analýze evolučných javov v kontrolovaných laboratórnych podmienkach. Prvá adaptívna evolúcia bola realizovaná už pred viac ako 100 rokmi Williamom Dallingerom [9].

2.1.2 Princíp

Pri experimentoch nie je nutné poznať celý genóm organizmu. Prípravou umelých génov alebo ich pozmenením a následným zavádzaním do genómu organizmu sa zaoberá génové inžinierstvo. Evolučné inžinierstvo nevyužíva genotyp, ale fakt, že vonkajšie podmienky prostredia ovplyvňujú fenotyp organizmu [10].

Princípom metódy je rast mikrobiálnej populácie pod presne určeným selekčným tlakom. Vrodené rysy buniek sa neprejavia [6]. Baktérie sú vystavované rôznym stresovým faktorom z vonkajšieho prostredia a dokážu sa adaptovať. Kmene baktérií využívané v priemysle sú neustále vystavované počas fermentácie viacerým stresovým faktorom (vysoká alebo nízka teplota, nízke pH, vysoký osmotický tlak, nedostatok živín, oxidácia). Bunky následkom toho stratia životaschopnosť a neplnia svoju funkciu. Dôsledkom toho je možné využiť adaptované organizmy pri fermentácii, pri ktorej sú mikroorganizmy odolnejšie voči stresu a zisk produktu je väčší [11].

Na experimenty sú využívané najmä dobre preštudované mikroorganizmy. Za posledných 25 rokov je evidovaný nárast počtu experimentov realizovaných s baktériou *Escherichia coli* a kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* [9].

2.1.3 Stratégie evolučného inžinierstva

Pri realizácii evolučného inžinierstva môžeme zvoliť jeden z viacerých možných postupov: adaptívnu laboratórnu evolúciu, genómovú evolúciu a mnohé ďalšie [6]. Mutácie nemusia vznikať len ako následok reakcie organizmu na stresový faktor, ale aj pôsobením rôznych fyzikálnych alebo chemických mutagénov [12].

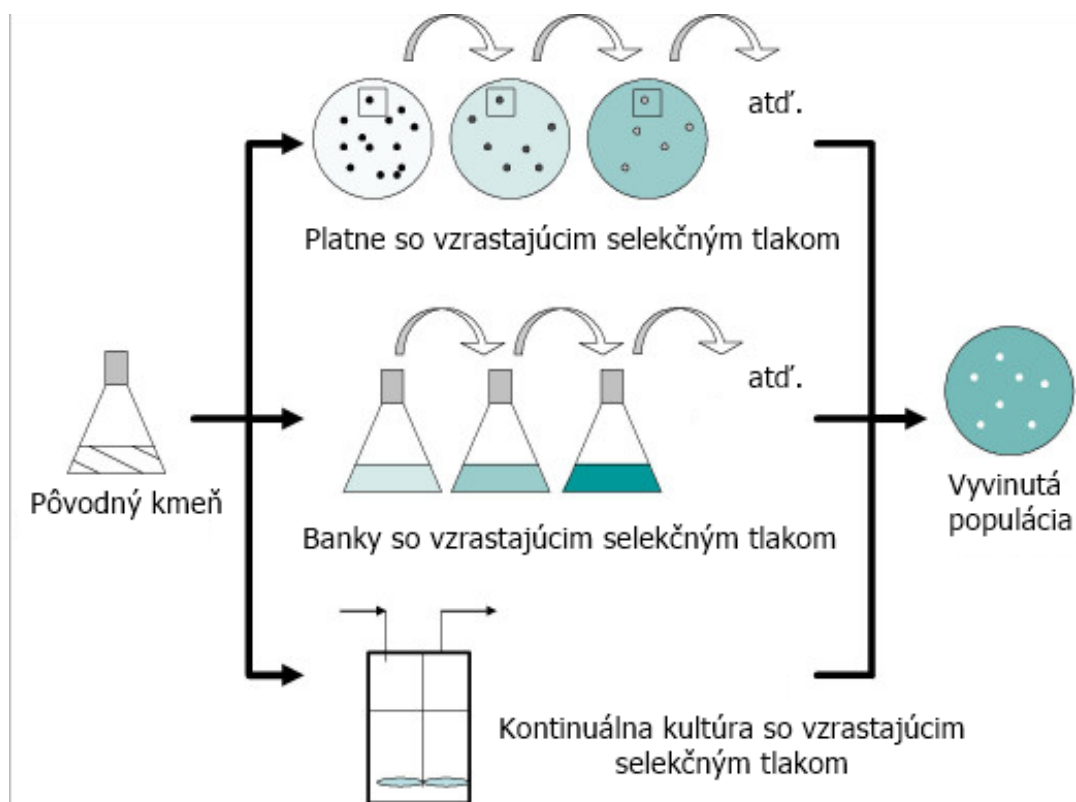
2.1.3.1 Mutagény

Pri realizácii riadenej evolúcie môžeme cielene využívať určitý mutagén. Chemické mutagény sú analógy zásad. Medzi fyzikálne mutagény zaradíme rôzne druhy žiarení (UV, α , β , γ). Spôsobujú vzrast frekvencie mutácií viac ako 1000-krát [12]. Avšak frekvencia priaznivých mutácií je nízka. Mutagenéza pomocou plazmy pri atmosférickom tlaku a izbovej

teplote (ARTP) poskytuje popri zvýšení rýchlostí mutácií aj väčší počet pozitívnych mutácií. Ďalšími výhodami ARTP sú veľká rozmanitosť mutantov, bezpečné operácie počas práce a žiadne environmentálne znečistenie [12].

2.1.3.2 Adaptívna laboratórna evolúcia

Na akumuláciu dostatočného počtu mutácií (vplyvom stresových faktorov) je nutná predĺžená kultivácia. Na vývoj mikrobiálnych buniek sa využíva sériová batch-kultivácia (v bankách, na agarových platniach), prípadne kontinuálna kultivácia v bioreaktore. Bunky kultúry sa v určitých intervaloch (v závislosti na ich raste) prenášajú do ďalších baniek s novým médiom vid'. Obr. 1. Podmienky prostredia pre bunky je nemožné takto kontrolovať. Kultivácia v chemostate (v bioreaktore) je preto výhodnejšia a kontrolou parametrov prostredia zabezpečuje konštantný rast buniek [6].



Obr. 1 Princíp evolučného inžinierstva [14]

2.1.4 Využitie

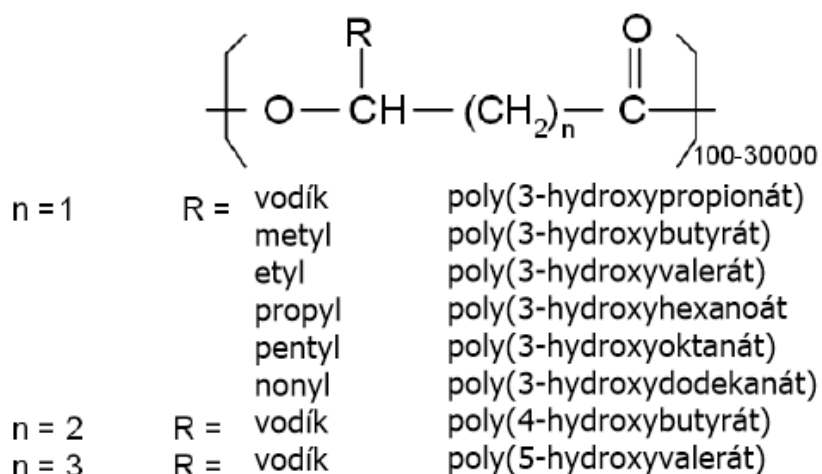
Klasické genetické inžinierstvo bolo úspešne doplnené umelým laboratórnym výberom buniek mikroorganizmov za účelom generovania potencionálne robustných a optimalizovaných mikrobiálnych produkčných systémov. Pre priemyselné využitie je dôležité, aby mal organizmus širšiu toleranciu k stresovým faktorom, čo môžeme doceliť u zmutovaných (adaptovaných) organizmov, ktoré týmto podmienkam vystavíme. Takéto mikroorganizmy nájdu uplatnenie v odvetví biotechnológií (výroba biopalív, priemyselné chemické syntézy, produkcia priemyselných a biofarmaceutických proteínov) [9]. Zaujímavé je využitie evolučného inžinierstva na analýzu fenotypov organizmov. Týmto spôsobom sa

dokáže zistiť až podstata vzniknutých mutácií a gény, ktoré ich spôsobujú. Výberom vhodných mutácií môžeme zlepšovať výťažky produktov produkovaných mikroorganizmami. Realizuje sa to väčšinou produkciou natívnych zlúčenín a aktiváciou novej cesty nenatívnych metabolitov [6].

Biologická katalýza ponúka oproti obvyčajnej chemickej syntéze ďalšie výhody ako napríklad, produkcia látok so stereoselektivitou. Využíva sa stereospecifita enzýmov, ktoré reakcie katalyzujú. Pri takejto reakcii vzniká jeden stereoizomér v prebytku (takže vznikajú produkty vysokej čistoty), zatiaľ čo pri chemickej syntéze vzniká často racemát – zmes enantiomérov produktu [9].

2.2 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty patria medzi prírodné polyestery a sú tvorené zo širokého spektra monomérov - reťazcov hydroxyalkanoátov (štruktúra vid'. Obr. 2). Delia sa preto na krátko-reťazcové scl-PHA (3–5 uhlíkov v monomére), PHA so stredným uhlíkovým reťazcom mcl-PHA (6–14 uhlíkov v monomére) a dlho-reťazcové lcl-PHA. Všetkých PHA štruktúr je známych viac ako 150 [15]. Poly(3-hydroxybutyrát) patrí medzi prvé objavené PHA. Bol izolovaný už v roku 1926 z bakteriálneho kmeňa *Bacillus megaterium* a za jeho objav nesie zásluhu Lemoigne [16].



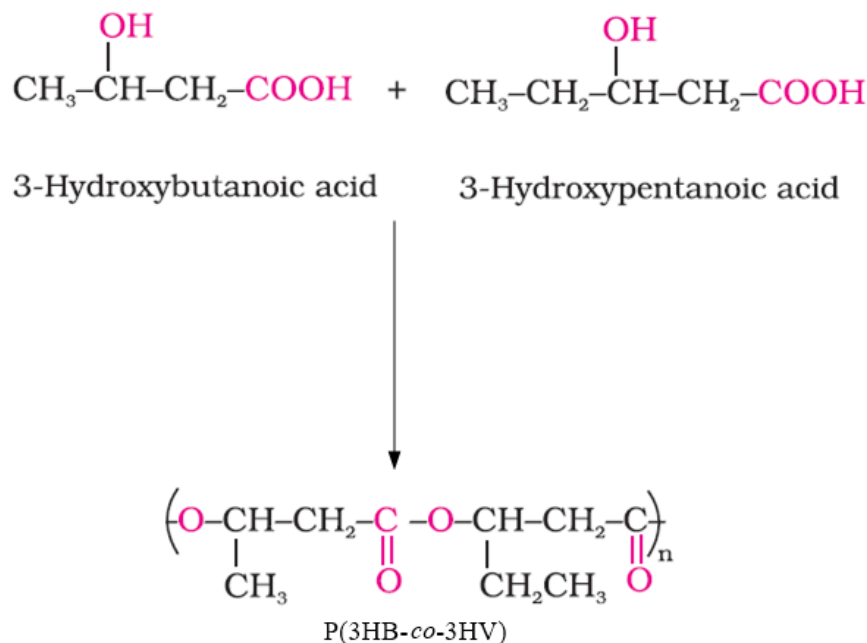
Obr. 2 Štruktúrny vzorec PHA [17]

Na štruktúru monoméru inkorporovaného v PHA molekule vplýva PHA-syntáza (polymeráza), prekursor hydroxyacyl-CoA thioesteru podporovaný enzýmom, ktorý riadi metabolické procesy v bunke a vonkajší zdroj uhlíka. Vlastnosti materiálu sú závislé na zložení polyméru (monomérnych jednotkách) a tým je zabezpečená existencia širokej škály PHA [18].

2.2.1 Štruktúra a vlastnosti kopolyméru P(3HB-co-3HV)

Medzi polyhydroxyalkanoáty patrí aj P(3HB-co-3HV). Tento termoplast je biodegradovateľný, netoxický a biokompatibilný. Vzniká kopolymerizáciou dvoch monomérov 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu (vid'. Obr. 3), ktoré sa v ňom nachádzajú

v rôznom množstve podľa substrátov dodaných mikroorganizmu. Podľa druhu mikroorganizmu podmieňuje prítomnosť 3-hydroxybutyrátu použitie glukózy, glycerolu, acetátu, pyruvátu alebo ich kombinácie ako substrátu. Reťazec 3-hydroxyvalerátu vzniká počas kultivácie s použitím prekursoru s nepárnym počtom uhlíkov, napríklad valerátu alebo propionátu (prípadne ich kombináciou) [19].



Obr. 3 Štruktúra kopolyméru P(3HB-co-3HV) [20]

Podľa pomeru 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu má výsledný polymér rozdielne vlastnosti. PHB je neohybný a krehký materiál, ktorý je ťažké previesť do kryštalickej podoby. 3-hydroxyvalerát dodáva vzniknutému polyméru P(3HB-co-3HV) väčšiu ohybnosť (pokles Youngových modulov), tuhosť (vzrast rázovej húževnatosti) a vzrast predĺženia (materiálu). Odolnosť voči pôsobeniu tepla (zahrievanie na vyššie teploty bez termálnej degradácie) dodáva však kopolyméru monomér 3-hydroxybutyrát. Zmena mechanických vlastností je ilustrovaná v Tab. 1. P(3HB-co-3HV) je jediný kopolymér, ktorý môže byť produkováný vo veľkých množstvách [15,20].

Tab. 1 Porovnanie vlastností polymérov [21]

Polymér	Teplota tavenia [°C]	Youngove modely [GPa]	Pevnosť v ťahu [MPa]	Predĺženie (materiálu) [%]	Rázová húževnatosť [J/m]
P(3HB)	179	3,5	40	5	50
P(3HB-co-3HV)					
3 mol.% 3HV	170	2,9	38	x ¹	60
9 mol.% 3HV	162	1,9	37		95
14 mol.% 3HV	150	1,5	35		120
20 mol.% 3HV	145	1,2	32		200
25 mol.% 3HV	137	0,7	30		400

2.2.2 Porovnanie vlastností PHA s konvenčnými plastami

Pri výrobe biodegradovateľných plastov sa kladie dôraz na dosiahnutie mechanických vlastností porovnateľných s konvenčnými plastami (najmä teplota tavenia, ktorá významne ovplyvňuje procesy spracovania plastov a ich využite). Teploty tavenia PHA plastov sa približujú teplotám tavenia viacerých termoplastov (viď. Tab. 1 a Tab. 2) [22].

Tab. 2 Teplota tavenia konvenčných termoplastov [22]

Druh plastu	Teplota tavenia [°C]
LPDE	105–115
HDPE	130–135
PP	160–170
POM	165–185
PA 6	215–225
PBT	225–230
PA 66	250–260
PET	250–260
PEEK	335–345
PTFE	340–345

Z environmentálneho hľadiska produkujú pri chemickom rozklade biodegradovateľné plasty menej skleníkových plynov, ako konvenčné plasty. Eliminuje sa tak vzrast globálneho otepľovania. Ďalšou výhodou týchto plastov sú nižšie požiadavky na energiu pri ich spracovaní (PHA – 57 MJ/kg, konvenčný plast: Nylon 6 – 120 MJ/kg) [2].

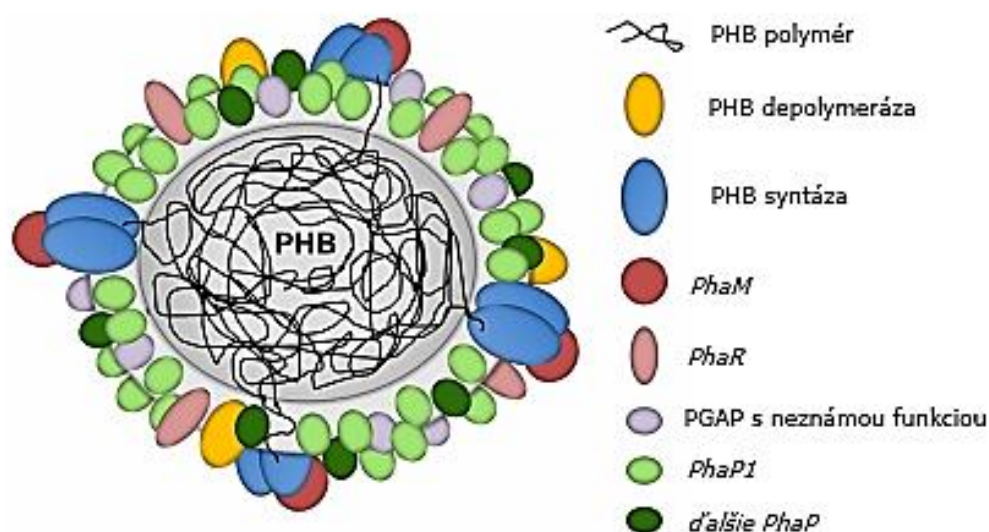
2.3 Produkcia PHA mikroorganizmami

Väčšina prírodných polyesterov obsahuje nejakú alebo všetky monoméne jednotky vyprodukované fermentáciou mikroorganizmov. PHA sú kumulované v prírode v bunkách organizmov. Formujú sa vo forme vnútrobunkových granúl, ktoré sú obalené vrstvou

¹ Dáta nie sú dostupné.

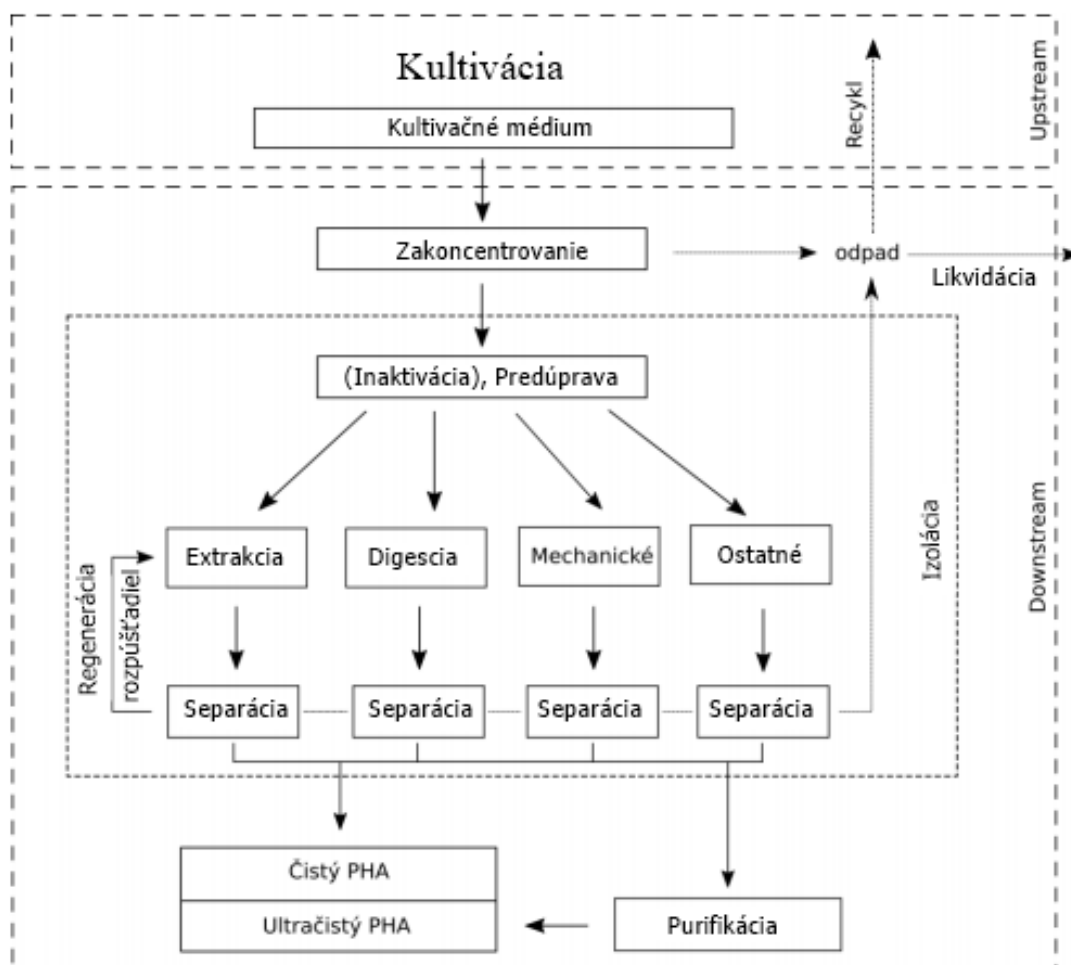
štruktúrnych a funkčných proteínov vid'. Obr. 4, čo zásadne ovplyvňuje izoláciu PHA. Fosfolipidy boli na základe PHB metabolizmu v starších výskumoch taktiež zaznačované do štruktúry obalovej vrstvy PHA inklúzie. Bolo však zistené, že ich prítomnosť v obalovej vrstve je založená na faktoch *in vitro* [23]. Nemožno ich vyrobiť synteticky – chemicky. Môžeme si však prispôbiť podmienky pre ich efektívnu produkciu. Baktéria, ktorú využívame pri produkcii PHA patrí do skupiny mikroorganizmov, pre ktoré musí byť uhlík v nadbytku a ostatné esenciálne prvky potrebné pre rast mikrobiálnej bunky (dusík, fosfor, horčík, kyslík) v limitnej koncentrácii. Dochádza k zabezpečeniu úschovy uhlíka a energie. Vďaka ukladaniu uhlíka (pre prípad zhoršených životných podmienok) môžu byť PHA katabolizované, keď to je potrebné. Niektoré mikroorganizmy však túto limitnú koncentráciu esenciálnych prvkov nevyžadujú [18,20,24].

Organizmy schopné produkcie PHA majú gén *phaC* kódujúci enzým PHA-syntázu, ktorá katalyzuje polymeráciu koenzýmu A thioesterov HA do PHA-polymérov. PHA-syntázy sú klasifikované do niekoľkých tried a rozdeľujú sa na prírodné a skonštruované. Za produkciu kopolyméru P(3HB-*co*-3HV) je zodpovedná prírodná PHA-syntáza triedy I. Keď sú zdrojom uhlíka mastné kyseliny s párnym počtom uhlíkov v reťazci akumuluje sa v bunkách niektorých baktérií P(3HB-*co*-3HHx). Prevažne však baktérie za daných podmienok produkujú PHB a až po pridaní prekursoru mastných kyselín s nepárnym počtom uhlíkov vzniká kopolymér P(3HB-*co*-3HV) [25].



Obr. 4 Štruktúra PHB inklúzie *in vivo* [23]

Výroba sa skladá z dvoch hlavných častí (vid'. Obr. 5): upstreamu (kultivačná časť) a downstreamu (izolácia a purifikácia produktu). Na celý proces produkcie PHA vplýva viacero faktorov [26].



Obr. 5 Schéma produkcie PHA [26]

2.3.1 Upstream

V procese upstream je dôležitý výber kmeňa baktérií: divý alebo geneticky upravený, podľa teploty – mezofilný alebo extrémofilný, gram-negatívny alebo gram-pozitívny, čistá alebo zmiešaná mikrobiálna kultúra. Taktiež je dôležitý pomer uhlíku ku zdroju dusíka, množstvo stopových prvkov, účinnosť aerácie, pH a proces dávkovania živín. Pri výbere živín je najdôležitejšia ich stabilita, čistota a sezónnosť (dostupnosť). Ovpływujú výsledné zloženie polyméru (zastúpenie monomérov, molárnu hmotnosť) a jeho senzorické vlastnosti (farba, vôňa) [20,27].

2.3.2 Downstream

Po fermentácii nasleduje proces downstream. Pri jeho technológii sa kladie dôraz na minimalizáciu energetickej náročnosti, odpadové hospodárstvo a začlenenie downstreamu do celého procesu. Na výsledný produkt sú kladené požiadavky vysokej čistoty – min. 99 % (najmä pre medicínske účely), vysoký výťažok a zachovanie vysokej molekulovej hmotnosti polyméru. Downstream sa rozdeľuje na tri časti (viď. Obr. 5): zakoncentrovanie biomasy, izolácia PHA, a ak je to nutné – prečistenie získaného produktu (extrakcia a izolácia získaného PHA alebo bielenie peroxidom vodíka). Zakoncentrovanie sa realizuje filtráciou, lyofilizáciou alebo odstred'ovaním. V procese izolácie PHA sú bunky v biomase rozrušené až

do zachytenia vznikajúceho polyméru. Existuje viacero spôsobov ako získať PHA z biomasy: extrakčné postupy, chemická digestia bunkových komponentov, mechanická izolácia (predúprava pred extrakciou a digestiou) a iné. Často sa využívajú aj ich kombinácie (kombinácia extrakcie a digestie alebo iné) [26]. Spôsob izolácie PHA sa vyberá podľa požiadaviek na čistotu produktu, spotreby činidiel, nákladov na energiu, procesnú obsluhu, množstvo odpadu [21].

2.3.2.1 Extrakcia

Pri extrakcii dochádza s využitím vhodného rozpúšťadla k prestupu PHA do kvapalnej fázy. Každé rozpúšťadlo je však účinné na iný typ PHA. Najčastejšie používané sú chloroform, propylénkarbonát dichlórmétán, dichlóretán. Pre kopolymér P(3HB-co-3HV) sa používajú dioly, trioly, estery kyseliny malónovej. Vďaka veľkej viskozite PHA roztoku je potrebné jeho veľké zriedenie. Spotreba veľkého množstva rozpúšťadiel je ekonomicky nevýhodná. Obvykle sa však využíva ich recyklácia [20,27].

2.3.2.2 Chemická digestia

Chemická digestia bunkových komponentov je metóda, pri ktorej sa PHA prevádza do pevnej fázy a ostatné časti buniek sú rozpustené pomocou chemikálií. Najčastejšie sa využíva chlórnan sodný pre jeho silný oxidačný účinok. Patrí sem aj enzymatická hydrolýza. Využíva sa pri nej vysoká selektivita enzýmov. Majú vysokú hydrolytickú aktivitu k polymérnym zložkám buniek, ale veľmi malú alebo žiadnu k PHA [26]. Enzymatická metóda vo vodnom prostredí bola vynájdená firmou Imperial Chemical Company. Na začiatku na biomasu pôsobí teplo, potom sa enzymaticky rozrušia bunky a pôsobením v činidlách aniónov sa nakoniec rozpustia bunkové materiály neobsahujúce PHA [21].

2.4 Alternatívne riešenia nevýhod výroby PHA

Nevýhodou pre rozširovanie výroby bioplastov je v súčasnosti ich vysoká výrobná cena. Cena konvenčných plastov je 3 až 4-krát nižšia ako cena PHA-bioplastov. Pri polypropyléne a polyetyléne sa cena pohybuje okolo 1,3–1,9 US\$/kg. Cena PHA plastu je medzi 5,0–6,1 US\$/kg. V celkovej výrobnej cene je zahrnutá vysoká cena vysoko čistých substrátov (napr. glukóza), nutnosť produkcie v diskontinuálnom batch alebo fed-batch kultivačnom móde, veľké množstvo rozpúšťadiel a pracovníkov (kvôli downstream procesom). Práca musí byť aseptická (kvôli používaniu čistej kultúry mikroorganizmov), čo je časovo, a tiež finančne náročné (sterilizácia všetkých pomôcok, priestorov a zariadení). Napriek tomu sa nachádzajú vo svete firmy, ktoré sa zaoberajú výrobou PHA (viď. Tab. 3) [15].

2.4.1 Využitie odpadov a odpadných produktov

Množstvo vedľajších produktov pri priemyselnej výrobe, v poľnohospodárstve alebo aj v potravinárstve neustále narastá. Týchto odpadov je možné sa zbaviť aj využitím pri výrobe iných produktov. Eliminujú sa tak ekologické problémy, ktoré spôsobuje ich zneškodňovanie a skladovanie (použitý fritovací olej), ale aj sa zníži cena výrobná cena daného produktu. V súčasnosti sa rozvíjajú technológie a postupy na ich úpravu a začlenenie do výrobného procesu [28].

Požiadavky na takéto substráty sú dostatočné množstvo a nemenná kvalita počas celého roka. Mali by byť taktiež rezistentné voči mikrobiálnej kontaminácii, stabilné, vhodné na uskladnenie [29].

Zakúpené vysokočisté substráty možno nahradiť odpadnými surovinami alebo odpadom, ktorý sa ukladá na skládkach. Komunálny odpad obsahuje až 53 % organického materiálu, ktorý môže byť po biotransformácii na prídavné produkty použitý pri produkcii PHA. Vďaka úprave chemickou hydrolýzou alebo priamou biotransformáciou triacylglycerolov môže byť takto využitý aj glycerol z výroby biodieselu alebo odpadný fritovací olej. Po úprave polysacharidov na baktériami utilizovateľnú podobu je možné využitie aj lignocelulózových materiálov vyskytujúcich sa napríklad aj v obaloch kávových zŕn [30]. Ďalšími odpadnými produktami vhodnými ako substrát pre baktérie pri tvorbe PHA sú vaječné škrupiny, srvátka, melasa, zemiakový škrob, kukuričný škrob, výlisky z vína, vedľajšie produkty pri výrobe olivového oleja, korene čakanky a iné [29].

2.4.2 Neaseptický proces produkcie PHA

Pre produkciu PHA môžu byť využité aj zmiešané kultúry, ktoré sú schopné PHA akumulovať. Výťažok polyméru pri produkcii je menší ako pri jednej čistej kultúre. Výhodou je však nižšia cena produkcie (nie je nutné dodržiavať asepticitu) [30].

Tab. 3 Firmy produkujúce PHA vo svete [15]

Firma	Oblasť záujmu	Substrát	Biokatalýza
Biomatera, Kanada	PHA živice	Obnoviteľné prírodné materiály	Nepatogénna, netransgenická baktéria izolované z pôdy
Biomer, Nemecko	PHB granulát	Cukor (sacharóza)	x
Bio-On Srl., Taliansko	PHB, PHVB oblasti	Cukrová repa	<i>Cupravidus necator</i>
Danimer Scientific, USA	mcl-PHA	Za studena lisovaný kanolový olej	x
Kaneka Corporation, Japonsko	PHB-PHH _x	Rastlinné oleje	x
Newlight Technologies L.L.C., USA	PHA živice	Kyslík zo vzduchu a uhlík zo zachytených emisí metánu	x
PHB Industrial S.A., Brazília	PHB, PHBV	Sacharóza	<i>Alcaligenes sp.</i>
PolyFerm, Kanada	mcl-PHA	Cukor, rastlinné oleje	Prírodné vybrané mikroorganizmy
Shenzhen Ecomann Biotechnology Co. L.td., Kanada	PHA granulát, živice, mikrokorálky	Cukor alebo glukóza	x
SIRIM Bioplastics Pilot Plant, Malajzia	Rozličné druhy PHA	Odpadný fritovací palmový olej (POME), surový palmový olej získaný z jej jadra	x
TianAn Biologic Materials Co. L.td., Čína	PHB, PHBV	Dextróza získaná z maniokového škrobu	<i>Cupravidus necator</i>
Tianjin GreenBio Material Co., Čína	P (3,4HB) fólie, granulát/penový granulát	Cukor	x

2.5 Bakteriálne druhy produkujúce PHA

Viac ako 90 druhov baktérií je schopných produkovať PHA (napríklad kmene: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Alcanivorax*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cupravidus*, *Delftia*, *Halomonas*, *Klebsiella*, *Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*). Organizmus na ich syntézu sa vyberá podľa rozličných kritérií. Musí byť nepatogénny, a tiež neschopný

produkcie toxínov. Dôležitá je aj schopnosť jeho buniek utilizovať nadbytočný uhlík, rýchlosť rastu, rýchlosť syntézy polyméru a maximálne množstvo naakumulovaného polyméru. Výhodou pri izolácii PHA je aj tenšia bunková stena [20,30].

2.5.1 *Halomonas halophila*

Starším názvom *Deleya halophila* je gram-negatívna striktne aeróbna baktéria. Pôvodne bola izolovaná blízko Alicante v juhovýchodnom Španielsku [31]. Patrí medzi halofily. Táto skupina mikroorganizmov je schopná prežívať v prostrediach s vysokými koncentraciami solí: 3–25 % (najmä NaCl). Dôsledkom vyrovnávania sa s týmito soľami je akumulácia organických zlúčenín (osmoprotaktantov) v ich bunkách [32]. V dôsledku adaptácie enzýmov na tlak vonkajšieho prostredia je na ich povrchu vytvorené veľké množstvo negatívne nabitých aminokyselinových zbytkov ako prevencia precipitácie [33].

2.5.1.1 *Využitie halofilov*

V prostrediach s nižšími koncentraciami solí je rozpustnosť enzýmov halofilov nízka, čo zväčša obmedzuje ich využitie. Vývoj ukazuje, že to môže byť výhoda práve pri aplikáciách, kedy chceme zachovať aktivitu a stabilitu enzýmu (napríklad z baktérie *Halobacterium salinarum* enzým p-nitrofenylfosfát-fosfatáza po zachytení v reverzných micelách v organickom médiu s nízkou koncentraciou solí) [33].

Tieto baktérie môžu byť využité ako producenti biodegradovateľných plastov. Bunky halofilov sú schopné akumulovať PHA, keď sa vyrovnávajú s osmotickým tlakom. Pri výbere organizmu na produkciu PHA sa zohľadňoval fakt, že vysoký obsah solí eliminuje mikrobiálnu kontamináciu, a taktiež možné získanie PHA z halofilov pomocou hypotonického lýzy buniek [34].

2.6 Využitie PHA

Priemyselný svet môže byť vyrobený z biologicky rozložiteľného materiálu. Prvá komerčná výroba PHA bola realizovaná Baptisom a Wernerom vo firme W.R. Grace & Co. (U.S.A). Vďaka získaniu patentu na produkciu a izoláciu P(3HB) začali vyrábať protetické komponenty a nite [35]. Širokospektrálne použitie dokazuje aj aplikácia týchto polymérov pri konštrukcii rôznych druhov elektrických a mechanických prístrojov. Polyhydroxyalkanoáty sa tiež využívajú nielen v obalovom a baliarskom priemysle na výrobu fólií a fľašiek (napr. na šampóny), ale aj v zdravotníctve ako dočasné implantáty, náhrady srdcových chlopní. Výskum prebieha aj v oblasti tkanivového inžinierstva – vývoj materiálov pre scaffoldy, na ktorých bude možné kultivovať nové tkanivá (musia byť biokompatibilné a zároveň bioresorbovateľné). V budúcnosti je možné aj použitie rozložiteľného biopodkladu, na ktorom budú rásť celé náhradné orgány [36]. V oblasti priemyslu dizajnu sa testuje výroba módnych a bytových doplnkov (výroba rámov okuliarov, nábytok). Použitie je možné aj na zubné kefky, ktoré tvoria tiež značnú časť odpadu [37]. PHA môžu tvoriť aj súčasť živíc používaných pri tepelnom spájaní spojov. Pre metabolické inžinierstvo ich využívame ako modelovú zlúčeninu. Taktiež sú vhodné náhrady plastov získaných z fosílnych palív (zemný plyn, ropa). Vďaka širokým možnostiam uplatnenia týchto zlúčenín, dochádza k rozvoju optimalizovaných kontrolných systémov pre syntézu PHA vo fermentáciách veľkých objemov [18,25,38].

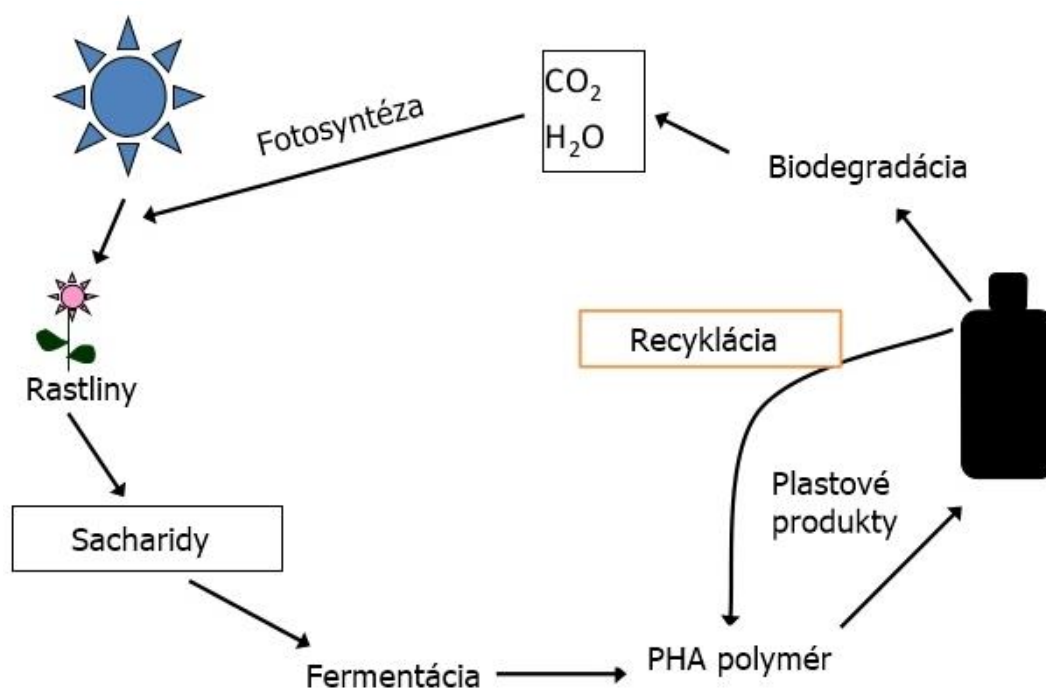
2.7 Likvidácia biodegradovateľných plastov

Po ukončení životnosti plastového produktu (opotrebovaný alebo nechcený výrobok) ho zneškodníme buď biodegradáciou alebo recykláciou (nie spolu s konvenčnými). Spaľovanie je taktiež možné, pretože ak sú materiály vyrobené z ekologických zdrojov, obnoviteľných (nie z fosílnych), tak ani spaľovanie nie je škodlivé [3].

Tak ako u konvenčných plastov je aj pri plastoch z PHA možná recyklácia. Zabezpečuje sa tak využitie odpadných plastov na výrobu nových plastových produktov. Pri recyklácii sa výrobok z plastu rozdrví a regranuluje. Vzniknutý granulát sa tepelne upraví a spracúva sa na nový produkt. Plasty sa nemôžu recyklovať nespočetne veľa krát. Po každej recyklácii sa menia (zhoršujú vlastnosti) daného polyméru. Z toho vyplýva, že plast sa môže využiť na výrobu produktu s nižšou kvalitou [39].

2.7.1 Biodegradácia plastov z PHA

Výhodou plastov z PHA je ich biodegradácia a začlenenie do ekosystému vid' Obr. 6. Bioplasty sú biologicky úplne rozložiteľné na vodu a oxid uhličitý, ktorý je využívaný v procese fotosyntézy. Zabezpečuje sa okrem produkcie kyslíka aj tvorba uhlíkového zdroja (sacharidov, ktoré sú pri fermentácii substrátom pre mikroorganizmy). Ich činnosťou vzniká PHA polymér, ktorý sa využije na tvorbu produktu a proces sa opakuje. Biodegradácia je realizovaná neenzymaticky alebo enzymaticky pomocou extracelulárnych enzýmov mikroorganizmov [21,40].



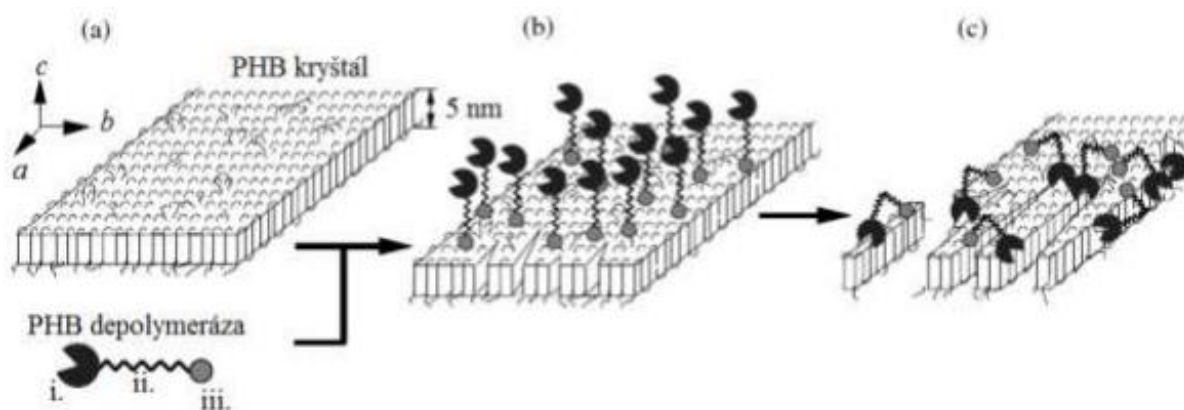
Obr. 6 Cyklus bioplastov [21]

2.7.1.1 Neenzymatická biodegradácia

Neenzymatická hydrolýza (napríklad v roztoku NaOH) spôsobuje degradáciu polymérov nachádzajúcich sa vnútri organizmu (implantáty). Dochádza k zmene štruktúry povrchu polyméru. Pri vyššom obsahu 3HV v P(3HB-co-3HV) je povrch hladší, koncentrácia dier v štruktúre je menšia, a teda aj rýchlosť degradácie je nižšia. Tento jav môže spôsobovať vzrast hydrofóbného charakteru pri vyššom obsahu 3HV v kopolymére [40].

2.7.1.2 Enzymatická biodegradácia

Extracelulárna enzymatická biodegradácia zahŕňa dve fázy (vid'. Obr. 7). Spôsobuje to heterogénny charakter enzymatickej reakcie. PHB polymér je hydrofóbny, ale enzýmy sú vo vode rozpustné. Extracelulárne enzýmy PHB depolymerázy, ktoré sú vylučované mikroorganizmami mimo bunku, obsahujú katalytickú a väzbovú doménu. V iniciačnej (prvej) fáze dochádza k ataku mikroorganizmu na polymérny reťazec (väzbová doména zabezpečí adsorpciu enzýmu na povrch polyméru). Množstvo naadsorbovaného enzýmu závisí na počte esterových väzieb na povrchu kryštálu polyesteru. Dôvodom je, že špecifická reakcia prebieha medzi týmito väzbami a väzbovou doménou enzýmu. Druhou fázou je reálny proces biodegradácie, pri ktorom katalytická doména zabezpečí hydrolýzu polymérneho reťazca ktorý sa rozpadá na vo vode rozpustné monoméry, diméry alebo zmes oligomérov. Sú transportované do buniek a využité ako zdroj uhlíka a energie [2,41]. Po hydrolýze PHA môžu byť teda využité monomérne jednotky hydroxyalkánových kyselín ako chirálny štartovací materiál pre chemický, farmaceutický priemysel alebo medicínu [35]. Prvým objaveným kmeňom mikroorganizmov na degradáciu PHA bol *Pseudomonas*. Chowdhury v roku 1963 z neho izoloval PHA depolymerázu [41].



Obr. 7 Depolymerizácia PHB, (a) povrchová štruktúra, (b) väzba depolymerázy na povrch PHB, (c) hydrolýza, (i) katalytická doména PHB depolymerázy, (ii) spájacia časť PHB depolymerázy, (iii) väzbová doména PHB depolymerázy [27]

Celá biodegradácia závisí na viacerých faktoroch ako sú napríklad: vlastnosti polyméru (prítomnosť, kryštalinita, povrch), teplota, prístup kyslíka (pri anaeróbných podmienkach vzniká metán), druh mikroorganizmu [21]. Napríklad so zvyšujúcou sa kryštalinitou klesá rýchlosť biodegradácie. Pri vyššom obsahu 3HV v kopolymére je reakčná rýchlosť vyššia, čo je spôsobené tým, že esterové väzby medzi jednotkami 3HV sú hydrolyzované depolymerázou rýchlejšie ako esterové väzby medzi 3HB jednotkami [40]. Pri tomto procese

sa menia mechanické vlastnosti dôsledkom rastúcich chýb materiálu spôsobených degradáciou. Znižuje sa Youngov model pružnosti a aj celková molekulová hmotnosť [42].

K intracelulárnej enzymatickej biodegradácii dochádza po dodaní limitujúceho faktoru mikroorganizmu alebo prekročení času kultivačného procesu (naakumuluje sa nadmerné množstvo polyméru v jeho bunkách). Nastáva vnútrobunková depolymerizácia PHA a dochádza k degradácii polyméru účinkom intramolekulárnych enzýmov. Metabolizuje sa a slúži ako zdroj uhlíka a energie [21].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Experimenty praktickej časti bakalárskej práce boli uskutočňované s baktériou *Halomonas halophila*. Baktérie boli vystavené stresovému faktoru – kyseline valérovej, ktorá má pozitívny vplyv na zvyšovanie obsahu PHA (konkrétne polyhydroxyvalerátu vo vyprodukovanom kopolymére), ale taktiež je inhibítorom rastu a delenia bakteriálnych buniek. Po ich adaptácii na tento stres boli tieto bunky izolované a po kultivácii bolo u nich analyzované množstvo biomasy, PHA a monomérov polyhydroxyvalerátu a polyhydroxybutyrátu. Hodnoty boli porovnávané s neadaptovanými kmeňmi.

3.1 Použité chemikálie, prístroje, mikroorganizmy

3.1.1 Použité chemikálie

- Agar powder, baktériologický (HIMEDIA, India)
- D-Glukóza monohydrát (LACH-NER, Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (LACH-NER, Česká republika)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (LACH-NER, Česká republika)
- Heptahydrát síranu horečnatého (LACH-NER, Česká republika)
- Glycerol, bezvodý (LACH-NER, Česká republika)
- Hydroxid sodný (LACH-NER, Česká republika)
- Chlorid sodný (LACH-NER, Česká republika)
- Chloroform (LACH-NER, Česká republika)
- Kyselina benzoová (LACH-NER, Česká republika)
- Kyselina sírová (LACH-NER, Česká republika)
- Kyselina valérová (SIGMA-ALDRICH, Nemecko)
- Metanol (VWR CHEMICALS PROLABO, USA)
- Pepton, baktériologický (HIMEDIA, India)
- Propionát sodný (SIGMA-ALDRICH, USA)
- Síran amónny (LACH-NER, Česká republika)
- Yeast extrakt (HIMEDIA, India)

3.1.2 Použité prístroje

- Analytické váhy PIONEER model PA 224C, OHAUS
- Centrifuga Hettich EBA 20
- Centrifuga SARTORIUS SIGMA AG model 1-14
- Laboratórne sklo a vybavenie
- Laminárny box Aura mini, BioAir – Euroclone
- Inkubátor 1000, HEIDOLPH
- Magnetická miešačka, Kartell, TKO
- Magnetická miešačka MMS-3000
- pH meter, pHTestr 30, Thermo Scientific
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300; kolóna: DB-WAX 30 m by 0,25 mm

- Spektrofotometer NanoPhotometer Pearl - Implen
- Temperovaná trepačka (inkubátor), Biosan ES-20
- Temperovaná trepačka UNIMAX 1010, Heidolph, Incubator 1000
- Termoblok, Stuart, SBH200D
- Váhy SCOUT PRO, OHAUS
- Vortex, Kartell, TK3S
- Vortex, Suspendor Bench Mixer, BENCHMARK

3.1.3 Použité mikroorganizmy

Bakteriálne kultúry *Halomonas halophila* CCM 3662 boli dodané v lyofilizovanom stave z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne a z nich boli pripravené kultúry do kryoskúmaviek.

3.2 Kultivácia mikroorganizmov

3.2.1 Kultivácia bakteriálnych inokúl

Bolo pripravené živné médium CNM pre bakteriálne bunky (zloženie vid'. Tab. 4). Pre prípravu pevného živného média (agarovú platňu) bol pridaný do určenej banky aj agarový prášok (17 g/l). Všetky banky boli premiešané, uzavreté zátkami a sterilizované. Určený počet Petriho misiek bolo naliatych v sterilnom očkovačom boxe a po zatuhnutí pevného živného média boli kultúry naočkované bakteriálnou kultúrou *Halomonas halophila* z kryoskúmavky. Banky s tekutým živným médiom boli po ochladení na laboratórnu teplotu taktiež naočkované bakteriálnou kultúrou. Inokulá boli kultivované v 100 ml Erlenmeyerových bankách s 50 ml objemom média 24 hodín pri 30 °C a otáčkach 190 rpm. Petriho misky boli kultivované v termostate (inkubátore) bez trepania 24 hodín a po náraste kolónií boli uchovávané v chlade.

Tab. 4 Zloženie živného média

zložka CNM	koncentrácia [g/l]
pepton	15
yeast extrakt	3
glukóza	1
NaCl	66
agar powder	17

3.2.2 Kultivácia baktérií v minerálnom produkčnom médiu s využitím rôznych substrátov

Pre účel produkcie biomasy PHA bolo pripravené minerálne produkčné médium pre bakteriálne bunky v 1 000 ml destilovanej vody (zloženie vid'. Tab. 5). Substráty pre bakteriálne bunky boli pridané do jednotlivých baniek podľa Tab. 7. Kombinácie substrátov

boli zvolené podľa výskumu C. Simon-Colina, ktorý sa zaoberal produkciou PHA halofilnými baktériami. Baktérie *Halomonas profundus* produkovali pri použití týchto substrátov PHA s najväčším obsahom 3HV [19]. Glycerol, glukóza a roztok MES boli pridávané až po sterilizácii, pretože roztoky boli predtým pripravené a sterilizované samostatne. Roztok média bol rozliaty do Erlenmeyerových baniek so substrátmi. Pre každú kombináciu substrátov boli realizované 2 paralelné pokusy v 250 ml Erlenmeyerových bankách s 100 ml objemom média. Po úprave roztokov na pH 7 boli banky premiešané, uzavreté zátkami a sterilizované. Po ochladení baniek na laboratórnu teplotu prebiehala práca výhradne v očkovačom boxe v sterilných podmienkach. Glukóza a glycerol boli pridané do určených baniek podľa Tab. 7. Do všetkých baniek bol pridaný 100 µl roztoku MES (zloženie vid'. Tab. 6) a boli naočkované množstvom bakteriálnej kultúry z inokula odpovedajúcom 10% objemu média. Všetky banky boli kultivované 72 hodín pri 30 °C (otáčky 190 rpm).

Tab. 5 Zloženie minerálneho produkčného média

zložka	koncentrácia [g/l]
(NH ₄) ₂ SO ₄	3
KH ₂ PO ₄	1
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	11,1
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,2
NaCl	66
zložka po sterilácii	
MES	1 ml/l
Glukóza	20 g/l

Tab. 6 Zloženie roztoku MES

zložka	koncentrácia [g/l]
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	9,7 g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	7,8 g
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,156 g
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,119 g
NiCl ₂ ·6 H ₂ O	0,118 g
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,1 g
0,1 M HCl	1 000 ml

Tab. 7 Substráty pre bakteriálne bunky

č.	substrát	c[g/l]	substrát	c[g/l]
1.	kyselina valérová	5		
2.	kyselina valérová	5	glukóza	10
3.	kyselina valérová	5	pyruvát sodný	10
4.	kyselina valérová	5	propionát sodný	10
5.	kyselina valérová	5	glycerol	10

3.3 Kultivácia baktérií s využitím kyseliny valérovej ako substrátu

Pre ďalšiu produkciu biomasy PHA bol zvolený substrát kyselina valérová (pri použití glukózy s koncentráciou 20 g/l). Množstvo 5 g/l kyseliny valérovej bolo pre bunky inhibujúce a nevedlo k produkcii dostatočného množstva biomasy. Jej koncentrácia bola znížená. V niektorých kultiváciách bola kyselina valérová pridávaná až po 24 hodinách kultivácie v minerálnom produkčnom médiu. Baktérie mohli rásť a adaptovať sa na podmienky prostredia v priebehu 48 hodín kultivácie. Kyselina valérová mala po pridaní do média na ne nižší inhibičný efekt.

3.3.1 Kultivácia baktérií s nižšou koncentráciou kyseliny valérovej

Bolo pripravené živné médium CNM (bez agaru) pre bakteriálne bunky (zloženie vid'. Tab. 4). Všetky banky boli premiešané, uzavreté zátkami a sterilizované. Média boli zaočkované bakteriálnou kultúrou z Petriho misiek a boli kultivované 24 hodín pri 30 °C (otáčky 190 rpm).

Minerálne produkčné médium bolo pripravené pre bakteriálne bunky rozmiešaním zložiek v destilovanej vode (zloženie vid'. Tab. 5). Roztok MES a glukóza boli pridávané až po sterilizácii pretože boli sterilizované predtým samostatne. Do Erlenmeyerových baniek boli navážené substráty o koncentrácii valerátu 2 g/l a 3 g/l. Roztok média bol rozliaty do baniek so substrátmi. Pre každú koncentráciu substrátu boli realizované 2 paralelné pokusy v 250 ml Erlenmeyerových bankách s 100 ml objemom média. Po úprave roztokov na pH 7 boli banky premiešané, uzavreté zátkami a sterilizované. Po ochladení baniek na laboratórnu teplotu prebiehala práca výhradne v očkovačom boxe v sterilných podmienkach. Do všetkých baniek bolo pridaných 100 µl roztoku MES (zloženie vid'. Tab. 6), 20 g/l glukózy a boli naočkované množstvom bakteriálnej kultúry z inokula odpovedajúcim 10 % objemu média. Všetky banky boli kultivované 72 hodín pri 30 °C a otáčkach 190 rpm.

3.3.2 Kultivácia baktérií s pridaním kyseliny valérovej o rôznych koncentráciách po 24 hodinách kultivácie

Postup kultivácie bol realizovaný obdobne ako pri predchádzajúcej kultivácii vid'. kapitola 3.3.1. Kyselina valérová o koncentráciách 0,1 g/l, 0,5 /l, 1 g/l, 2 g/l a 3 g/l bola pridávaná až po 24 hodinách kultivácie v minerálnom produkčnom médiu.

3.4 Kultivácia baktérií pre porovnanie pôvodných kmeňov a adaptovaných kmeňov na kyselinu valérovú

Pre porovnanie produkcie PHA a obsahu 3HV v kopolymére medzi pôvodným kmeňom a kmeňmi adaptovanými na kyselinu valérovú boli realizované kultivácie s cieľom zisku adaptovaného kmeňa vid'. Obr. 8.

3.4.1 Kultivácia baktérií na pevnom živnom médiu pre ich následnú izoláciu

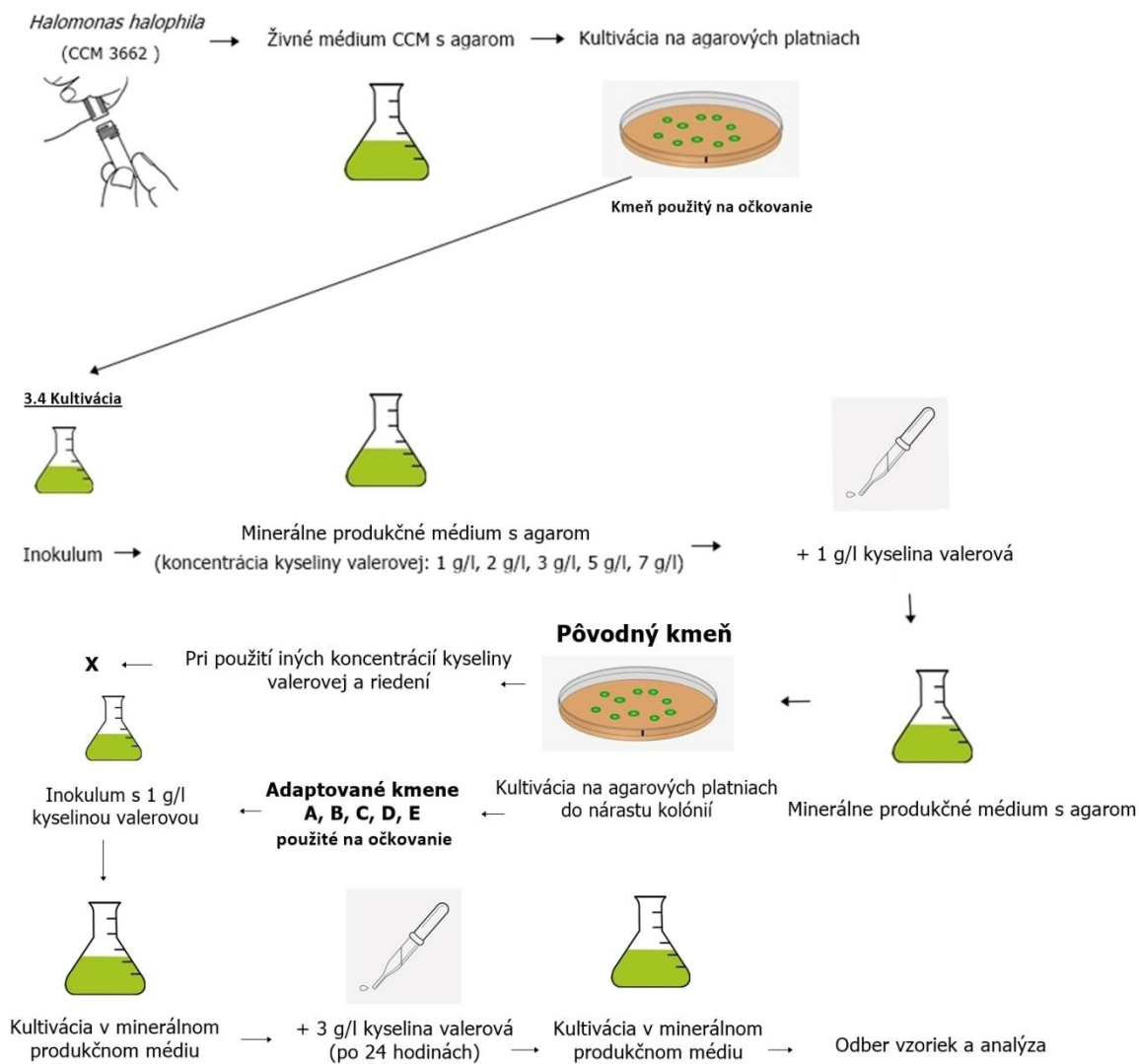
Bakteriálne inokulá boli pripravené obdobne ako pri predchádzajúcej kultivácii vid'. kapitola 3.3.1. Bolo pripravené minerálne médium pre bakteriálne bunky navážením a rozmiešaním zložiek v destilovanej vode (zloženie vid'. Tab. 5). Taktiež bol pridaný aj agarový prášok o koncentrácii 17 g/l. Roztok MES a glukóza boli pridávané až po sterilizácii, pretože boli sterilizované predtým samostatne. Do Erlenmeyerových baniek bol taktiež pridaný valerát s koncentraciou 1 g/l, 2 g/l, 3 g/l, 5 g/l a 7 g/l. Po úprave roztokov na pH 7 boli banky premiešané, uzavreté zátkami a sterilizované. Po ochladení baniek na laboratórnu teplotu prebiehala práca výhradne v očkovačom boxe v sterilných podmienkach. Do všetkých baniek bol pridaný 100 µl roztoku MES (zloženie vid'. Tab. 6), 20 g/l glukózy, valerát o koncentrácii 1 g/l a boli naočkované bakteriálnou kultúrou z inokula. Pre každú koncentráciu valerátu boli pripravené 4 agarové platne (2 boli očkované kultúrou s riedením 10^{-1} a 10^{-2} , zvyšné 2 boli očkované neriedenou kultúrou). Všetky misky boli kultivované pri 30 °C až do nárastu kolónií (cca 7 dní) a ďalej boli využité len misky s narastenými kolóniami.

3.4.2 Kultivácia izolovaných adaptovaných baktérií v minerálnom produkčnom médiu

Bolo pripravené živné médium CNM (bez agaru) pre adaptované bakteriálne bunky (zloženie vid'. Tab. 4) s pridaním valerátu o koncentrácii 1 g/l. Po úprave roztokov na pH 7 boli všetky banky premiešané, uzavreté zátkami a sterilizované. Médiá boli zaočkované adaptovanou bakteriálnou kultúrou z vybraných Petriho misiek (vid'. Tab. 8) a pre porovnanie aj s neadaptovanou kultúrou a boli kultivované 24 hodín pri 30 °C otáčkach 190 rpm. Bolo pripravené minerálne produkčné médium pre bakteriálne bunky rozmiešaním zložiek v destilovanej vode (zloženie vid'. Tab. 5). Roztok MES a glukóza boli pridávané až po sterilizácii, pretože boli sterilizované predtým samostatne. Banky boli vysterilizované. Po ochladení baniek na laboratórnu teplotu prebiehala práca výhradne v očkovačom boxe v sterilných podmienkach. Do všetkých baniek bol pridaný 100 µl roztoku MES (zloženie vid'. Tab. 6), 20 g/l glukózy a boli naočkované množstvom bakteriálnej kultúry z inokula odpovedajúcim 10% objemu média. Všetky banky boli kultivované 24 hodín pri 30 °C (otáčky 190 rpm). Do Erlenmeyerových baniek bol pridaný valerát s koncentraciou 3 g/l. Po úprave roztokov na pH 7 boli banky premiešané, uzavreté zátkami a kultivované 48 hodín pri rovnakých podmienkach.

Tab. 8 Adaptované kmene použité ku kultivácii s cieľom produkcie PHA

označ.	kys. valérová [g/l]
A	3
B	3 (ried. 10^{-1})
C	2
D	1
E	1 (ried. 10^{-1})



Obr. 8 Schéma kultivácií vedúcich k zisku adaptovaných kmeňov baktérií

3.4.3 Príprava kryoskúmaviek s adaptovanými baktériami

Boli pripravené kryoskúmavky (4 pre každú koncentráciu valerátu) napipetovaním 1 ml bakteriálnej kultúry z inokula do 0,5 ml 30 obj. % glycerolu. Kryoskúmavky boli uschovávané pri teplote -80 °C pre ďalšie využitie.

3.5 Stanovenie obsahu biomasy

Obsah biomasy bol stanovovaný po 48 hodinách kultivácie. U všetkých vzoriek bolo použité gravimetrické stanovenie obsahu biomasy a u niektorých experimentov boli vzorky analyzované aj spektrofotometricky.

3.5.1 Spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy

Koncentrácia biomasy bola stanovovaná meraním absorbancie (intenzity zákalu) v triplikátoch kvôli štatistickej váhe dát pri 630 nm proti destilovanej vode ako blanku. U všetkých vzoriek bolo prípadne použité vhodné riedenie destilovanou vodou.

3.5.2 Gravimetrické stanovenie obsahu biomasy

Na centrifugáciu bol uskutočnený odber po 10 ml z každej banky so suspenziou paralelne do 2 centrifugačných skúmaviek. Odoberaté vzorky boli odstredované 5 minút na centrifúge pri otáčkach 6 000 rpm. Supernatant bol zo skúmaviek odliaty a sediment bol rozsuspendovaný s 1 ml destilovanej vody. Obsah skúmaviek bol prevedený do menších centrifugačných skúmaviek a boli stáčané na centrifuge 4 minúty pri otáčkach 1000 rpm. Supernatant bol odliaty a obsah skúmavky bol sušený v sušiarňi 72 hodín. Po vysušení boli skúmavky zvážené a bola určená koncentrácia biomasy v g/l.

3.6 Stanovenie obsahu PHA (a jednotlivých monomérov) v biomase

Biomasa z jednotlivých vzoriek bola analyzovaná na plynovom chromatografe s FID detekciou na obsah PHA a zastúpenie jednotlivých monomérov v kopolymére. Plynová chromatografia nie je absolútna metóda, preto je nutné porovnávať vzorky na základe rovnakého množstva vnútorného štandardu (transesterifikačná zmes – 5 mg/ml kyselina benzoová v 15% H_2SO_4 v metanole). Kyslou hydrolýzou a následnou esterifikáciou vznikajú prchavé metylestery 3-hydroxyalkanových kyselín, ktoré možno analyzovať plynovou chromatografiou.

3.6.1 Príprava štandardov pre kalibračnú závislosť

Bola pripravená kalibračná rada pre stanovenie obsahu monomérov v jednotlivých vzorkách navážením známych množstiev štandardu kopolyméru P(3HB-co-3HV) s obsahom 12 mol. % 3-hydroxyvalerátu v rozmedzí 2–10 μg . Určené množstvá boli navážené do krimpovacích vialiek, do ktorých bol pridaný 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikačnej zmesi. Po zakrimpovaní bol obsah vialiek esterifikovaný v termobloku 180 min. pri teplote 94 °C. Po vychladení bola zmes extrahovaná 500 μl 0,05 M NaOH. Po oddelení fáz bolo do novej skrutkovacej vialky pipetovaných 950 μl chloroformu a 50 μl spodnej fázy (obsahovala methylestery kyselín). Štandardy boli analyzované na plynovom chromatografe s plameňovo-ionizačným detektorom.

3.6.2 Príprava vzoriek na ich analýzu plynovou chromatografiou

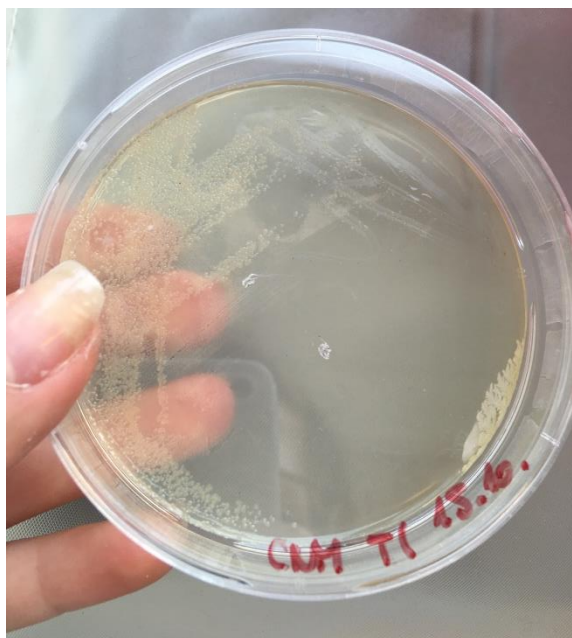
Množstvo 9–11 mg biomasy z gravimetrického stanovenia bolo navážených do krimpovacích vialiek. 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikačnej zmesi bolo pridaných k biomase. Po zakrimpovaní bol obsah vialiek esterifikovaný v termobloku 180 min pri teplote 94 °C. Po vychladení bola zmes extrahovaná 500 μl 0,05 M NaOH. Po oddelení fáz bolo do novej skrutkovacej vialky pipetovaných 950 μl chloroformu a 50 μl spodnej fázy (obsahovala methylestery kyselín). Vzorky boli analyzované na plynovom chromatografe. Pri každej vzorke boli uskutočnené 2 paralelné stanovenia.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

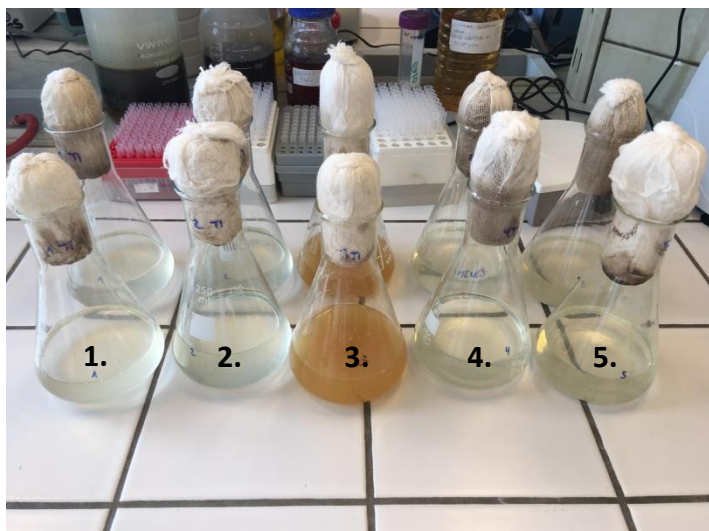
4.1 Kultivácia baktérií v minerálnom produkčnom médiu s využitím rôznych substrátov

Na kultiváciu baktérií v minerálnom produkčnom médiu bol využitý valerát alebo kombinácia valerátu s iným substrátom podľa výskumu C. Simon-Colina, ktorý sa zaoberal produkciou PHA halofilnými baktériami. Baktérie *Halomonas profundus* produkovali pri použití týchto substrátov PHA s najväčším obsahom 3HV [19].

Pri použití kyseliny valérovej (č. 1), kombinácie substrátov kyselina valérová a glukóza o vyššej koncentrácii (č. 2) alebo kyselina valérová a propionát (č. 4) boli pozorované nerozpustné zrazeniny v bankách po kultivácii (viď. Obr. 10). Najväčší zákal bol pozorovaný v bankách po použití substrátov kyseliny valérovej a pyruvátu (č. 3). V jednotlivých bankách nedošlo po kultivácii k zmene pH. Vzorky boli analyzované na obsah biomasy. Vznik dostatočného množstva biomasy bol docielený len pri použití kyseliny valérovej a pyruvátu (kombinácia č. 3). Tieto vzorky boli analyzované na obsah PHA na plynovom chromatografe (viď. Tab. 9). Pri ostatných kombináciách nebolo dosiahnuté požadované množstvo biomasy vyprodukovanej baktériou *H. halophila* na analýzu vzorky plynovou chromatografiou. Z analýzy vzorky vyplýva, že obsah 3HV v mol. % bol v kopolymére vysoký, ale množstvo vytvorenej biomasy bolo veľmi nízke (menej ako 0,1 g/l). Obsah kopolyméru v biomase dosiahol tiež nízke hodnoty. Substráty mali pri danej koncentrácii inhibujúci účinok na produkciu biomasy baktériami.



Obr. 9 Bakteriálne bunky *Halomonas halophila* na pevnom živnom médiu



Obr. 10 Erlenmeyerove banky s *Halomonas halophila* po kultivácii s využitím rôznych substrátov

Tab. 9 Analýza vzorky na obsah PHA

substrát	c_{biomasa} [g/l]	PHA [hm. %]	PHA [g/l]	3HV [mol. %]
kys. valérová (5 g/l) + pyruvát (10 g/l)	$0,07 \pm 0,03$	2,47	$1,64 \cdot 10^{-3}$	87,07

4.2 Kultivácia baktérií s využitím kyseliny valérovej ako substrátu

4.2.1 Kultivácia baktérií s nižšou koncentráciou kyseliny valérovej

Koncentrácia kyseliny valérovej 5 g/l bola pre bunky inhibujúca a nevedla k produkcii dostatočného množstva biomasy. Pri kultivácii baktérií boli použité nižšie koncentrácie 2 a 3 g/l. Väčší obsah PHA bol zistený vo vzorke pri použití kyseliny s vyššou koncentráciou 3 g/l. Obsah monoméru 3HV bol však pri tejto koncentrácii nižší v porovnaní so vzorkou z kultivácie, počas ktorej bola pridaná kyselina valérová o koncentrácii 2 g/l (pri použití glukózy s koncentráciou 20 g/l).

Tab. 10 Analýza vzoriek na obsah PHA

kys. valérová [g/l]	c_{biomasa} [g/l]	PHA [hm. %]	PHA [g/l]	3HV [mol. %]
2	$0,41 \pm 0,01$	10,14	$4,16 \cdot 10^{-2}$	90,71
3	$0,71 \pm 0,02$	12,30	$8,80 \cdot 10^{-2}$	89,34

4.2.2 Kultivácia baktérií s pridaním kyseliny valérovej o rôznych koncentráciách po 24 hodinách kultivácie

Kyselina valérová bola pridávaná do minerálneho produkčného média až po 24 hodinách kultivácie baktérií v minerálnom produkčnom médiu. Baktérie mohli vďaka tomu lepšie rásť a adaptovať sa na podmienky prostredia. U baktérií prebehla lag-fáza. Kyselina s inhibičným účinkom pôsobila na baktérie až v štádiu exponenciálnej fáze rastu. Koncentrácie kyseliny valérovej, ktoré boli použité pri kultivácii boli nižšie alebo rovnaké ako v predchádzajúcej kultivácii popísanej v kapitole 4.2.1 (0,1 g/l, 0,5 g/l, 1 g/l, 2 g/l a 3 g/l).

Pri koncentrácii použitej kyseliny 2 g/l a 3 g/l bol dosiahnutý vyšší obsah PHA v hm. %, ako pri kultivácii 4.2.1, kde bola kyselina pridávaná bezprostredne po naočkovaní média baktériami (počas lag-fázy). Najvyšší obsah PHA dosahovali vzorky s nižšími koncentraciami valerátu 0,1 a 0,5 g/l. Obsah 3-hydroxyvalerátu bol však pri predchádzajúcej kultivácii vyšší. Z výsledkov analýzy tejto kultivácie vyplýva, že obsah 3HV v kopolymére je najvyšší pri použití koncentrácie valerátu 3 g/l, a to 23,41 mol. %. Pri kultivácii s prídavkom kyseliny valérovej bezprostredne po očkovaní bol však dosiahnutý obsah 3HV vo vzorkách cez 80 mol. % (vid'. Tab. 10), ale celkové výťažky kopolyméru boli takmer zanedbateľné. Spektrofotometrickým meraním optickej hustoty vzoriek pri 630 nm bola zistená najnižšia optická hustota u vzorky, pri ktorej bola použitá koncentrácia valerátu 1 g/l a najvyššia pri najnižšej koncentrácii valerátu 0,1 g/l.

Tab. 11 Analýza vzoriek na obsah PHA

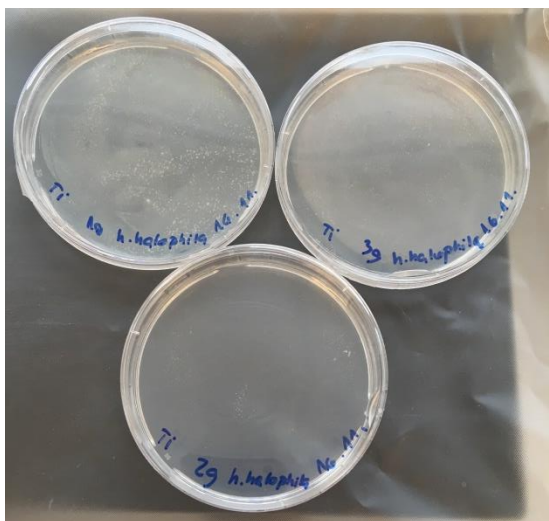
kys. valérová [g/l]	c _{biomasa} [g/l]	PHA [hm. %]	PHA [g/l]	3HV [mol. %]
0,1	4,87 ± 0,00	61,93 ± 2,82	3,11 ± 0,00	2,19 ± 0,03
0,5	4,73 ± 0,33	62,74 ± 6,53	2,95 ± 0,10	8,63 ± 0,65
1	1,96 ± 1,05	51,17 ± 7,93	1,04 ± 0,69	17,57 ± 3,09
2	4,57 ± 0,21	61,85 ± 5,82	2,83 ± 0,39	6,56 ± 0,16
3	2,11 ± 1,33	58,47 ± 5,02	1,17 ± 0,67	23,41 ± 0,39

Tab. 12 Optická hustota vzoriek pri 630 nm

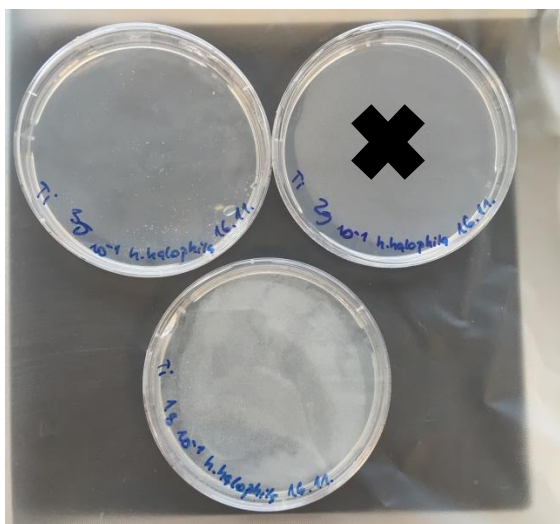
kys. valérová [g/l]	OD ₆₃₀ [a.u.]
0,1	26,500 ± 0,450
0,5	7,200 ± 0,300
1	5,700 ± 0,150
2	24,750 ± 0,552
3	8,375 ± 0,125

4.3 Porovnanie pôvodného kmeňa baktérií a adaptovaných kmeňov na kyselinu valérovú

Baktérie boli adaptované na kyselinu valérovú ako stresový faktor. Po kultivácii baktérií na pevnom živnom médiu neboli pozorované kolónie pri vyšších koncentráciách kyseliny valérovej 5 g/l a 7 g/l a taktiež aj pri koncentrácii kyseliny valérovej 2 g/l pri použití riedenia kultúry 10^{-1} (viď. Obr. 12). Minerálne produkčné médium bolo pri kultivácii zaočkované adaptovanými baktériami na koncentrácie kyseliny valérovej 1 g/l, 2 g/l (okrem riedenia kultúry 10^{-1}) a 3 g/l. Baktérie sa teda dokázali adaptovať na kyselinu valérovú o nižších koncentráciách (viď. Obr. 11 a Obr. 12). Koncentrácie 5 g/l a 7g/l boli pre baktérie inhibujúce.

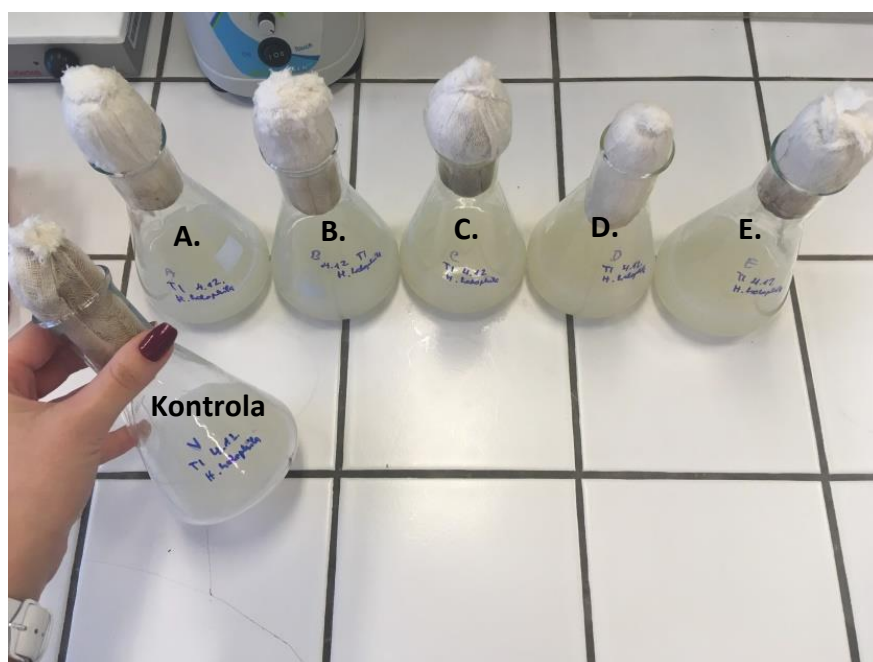


Obr. 11 Adaptované bakteriálne kolónie na agarových platniach



Obr. 12 Adaptované bakteriálne kolónie na agarových platniach v porovnaní s platňou bez pozorovateľných kolónií

Po kultivácii adaptovaných baktérií v minerálnom produkčnom médiu bol pozorovateľný väčší zákal ako pri pôvodnom kmeni baktérií (viď. Obr. 13). Z výsledkov analýzy vzoriek na plynovom chromatografe vyplýva, že najväčšia koncentrácia vytvorenej biomasy a taktiež najväčší obsah monoméru 3HV bol u vzorky B (baktérie adaptované na koncentráciu kyseliny valérovej 3 g/l s riedením kultúry 10^{-1}). Pri predchádzajúcej kultivácii 4.2.2, kde bol použitý pôvodný kmeň pri rovnakej koncentrácii kyseliny valérovej, bolo vytvorené množstvo biomasy a obsah 3HV v mol. % vyšší. U vzorky z tejto kultivácie bola nameraná dvojnásobne väčšia optická hustota ako u vzoriek pri tomto experimente. Najnižšie množstvo vytvorenej biomasy nebolo pri tejto kultivácii u pôvodného kmeňa baktérií (kontrolná vzorka), ale u vzorky A (baktérie adaptované na koncentráciu kyseliny valérovej 3 g/l). Obsah 3HV vo vytvorenom kopolymére bol najnižší u vzorky C (baktérie adaptované na koncentráciu kyseliny valérovej 2 g/l). Analyzovaná vzorka pôvodného kmeňa baktérií (kontrolná vzorka) vykazuje ale nízke hodnoty koncentrácie biomasy a obsahu 3HV v porovnaní so vzorkou B. Najmenšiu nameranú optickú hustotu má vzorka z kultivácie pôvodných kmeňov baktérií a najväčšiu vzorka B, čo potvrdzuje dosiahnutý najväčší obsah biomasy v tejto vzorke. Kmeň B sa podľa výsledkov významne odlišuje od pôvodného. Zatiaľ, čo ostatné kmene sú celkom podobné.



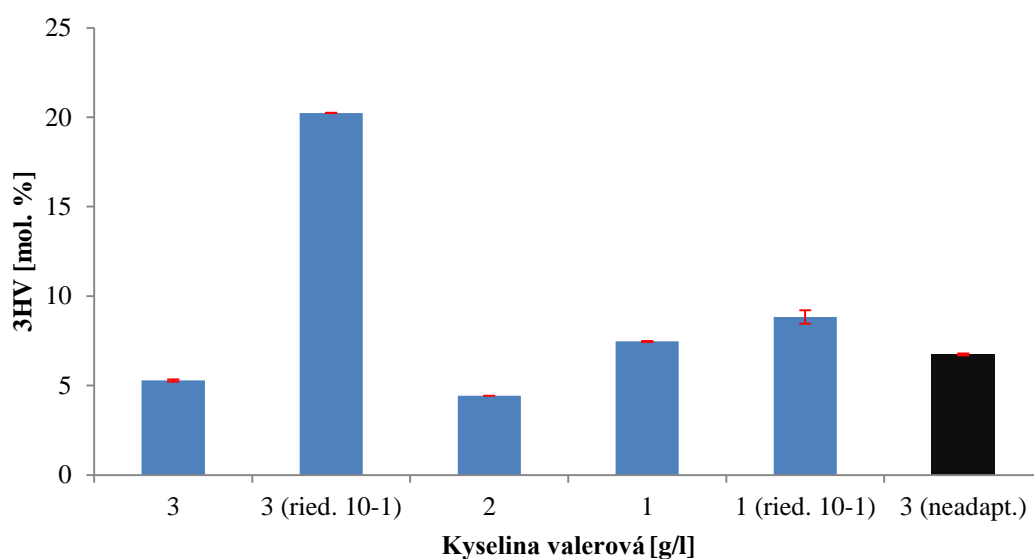
Obr. 13 Adaptované bakteriálne bunky po kultivácii v minerálnom produkčnom médiu v porovnaní s neadaptovanými bunkami

Tab. 13 Analýza vzoriek na obsah PHA

označ.	kys. valérová [g/l] ²	c _{biomasa} [g/L]	PHA [hm. %]	PHA [g/l]	3HV [mol. %]
A	3	1,055 ± 0,055	50,76 ± 2,86	0,5339 ± 0,0023	5,28 ± 6,15E-02
B	3 (ried. 10 ⁻¹)	1,185 ± 0,015	60,36 ± 0,14	0,7152 ± 0,0074	20,24 ± 4,01E-03
C	2	1,125 ± 0,015	59,75 ± 0,08	0,6722 ± 0,0098	4,43 ± 1,61E-03
D	1	1,095 ± 0,025	55,74 ± 1,98	0,6099 ± 0,0078	7,47 ± 2,51E-02
E	1 (ried. 10 ⁻¹)	1,120 ± 0,080	43,85 ± 2,66	0,4890 ± 0,0053	8,84 ± 3,75E-01
Kontrola	3 (neadapt.)	1,070 ± 0,010	51,63 ± 1,19	0,5525 ± 0,0179	6,74 ± 4,94E-02

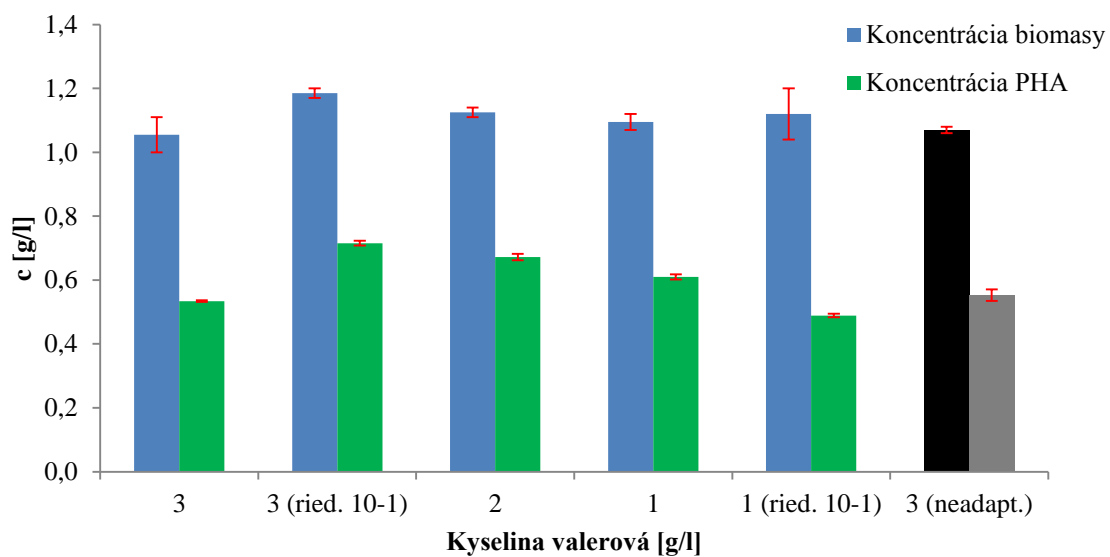
Tab. 14 Optická hustota vzoriek pri 630 nm

označ.	kys. valérová [g/l] ²	OD ₆₃₀ [a.u.]
A	3	4,300 ± 0,100
B	3 (ried. 10 ⁻¹)	4,950 ± 0,075
C	2	4,425 ± 0,075
D	1	4,638 ± 0,038
E	1 (ried. 10 ⁻¹)	3,913 ± 0,013
Kontrola	3 (neadapt.)	3,825 ± 0,100

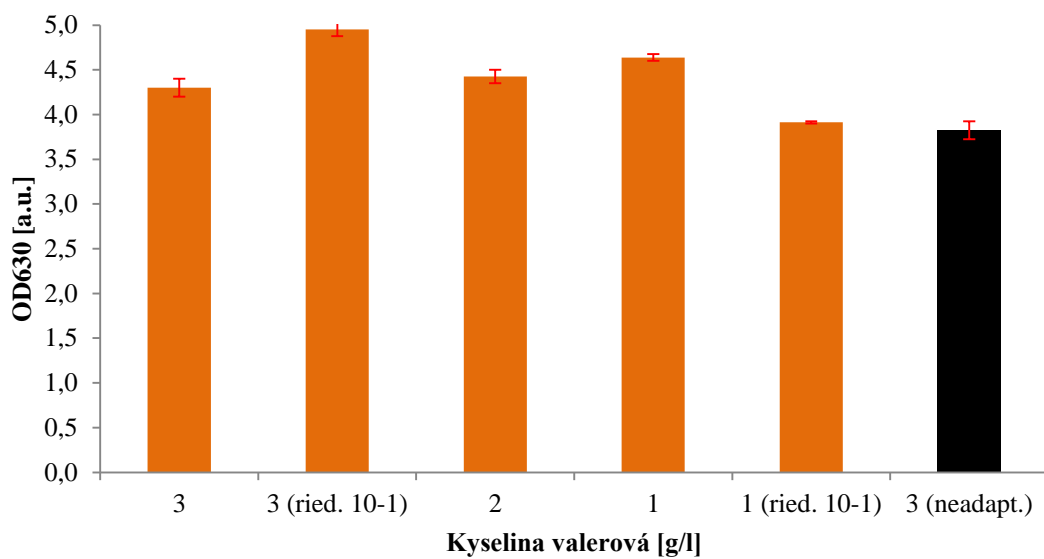


Graf 1 Množstvo 3HV v kopolymére u baktérií adaptovaných na rôzne koncentrácie kyseliny valérovej v porovnaní s neadaptovaným kmeňom

² Koncentrácia kyseliny valerovej na ktorú boli baktérie adaptované. Pridávaná koncentrácia prekursoru kyseliny valerovej bola 3 g/l.



Graf 2 Množstvo biomasy a PHA u baktérii adaptovaných na rôzne koncentrácie kyseliny valérovej v porovnaní s neadaptovaným kmeňom



Graf 3 Optická hustota pri 630 nm u baktérii adaptovaných na rôzne koncentrácie kyseliny valérovej v porovnaní s neadaptovaným kmeňom

5 ZÁVER

Cieľom bakalárskej práce bola produkcia polyhydroxyalkanoátov baktériami *Halomonas halophila* so zameraním sa na vyšší obsah 3-hydroxyvalerátu v kopolymére P(3HB-co-3HV), ktorý sa v týchto baktériách tvorí intracelulárne. Vznik kopolyméru bol dosiahnutý pridaním kyseliny valérovej ako prekursoru pre bakteriálne bunky. Kultivačné podmienky boli optimalizované, pretože kyselina valérová má zároveň inhibičný efekt na rast buniek. Vyššie koncentrácie ako 3 g/l nevedú k produkcii dostatočnej koncentrácie biomasy ani PHA. Pri veľmi nízkych koncentráciách kyseliny valérovej 0,1 g/l a 0,5 g/l bol obsah 3HV v PHA nízky. Vyhovujúca koncentrácia tohto substrátu, pri ktorej bunky vykazujú dostatočnú produkciu PHA, je 3 g/l. Kyselina by mala byť pridaná až po 24 hodinách kultivácie v minerálnom produkčnom médiu. Bunky sú už takmer v stacionárnej fáze a inhibičný efekt kyseliny má na nich menší vplyv, čo navýši množstvo utilizovaných PHA.

Metódami evolučného inžinierstva boli získané kmene baktérií *Halomonas halophila* adaptované na kyselinu valérovú. Nárast kolónií bol pozorovaný pri nižších koncentráciách kyseliny 1 g/l, 2 g/l (okrem riedenia kultúry 10^{-1}) a 3 g/l. Koncentrácie kyseliny 5 g/l a 7g/l boli pre baktérie inhibujúce. Porovnaním pôvodného kmeňa baktérií a kmeňov adaptovaných na rôzne koncentrácie kyseliny valérovej z hľadiska produkcie PHA a obsahu 3HV v kopolymére bolo zistené, že vyšší obsah 3HV v kopolymére bol dosiahnutý u adaptovaných kmeňov. U adaptovaného kmeňa označeného ako B bol obsah 3HV v kopolymére 20,24 mol. %. U pôvodných kmeňov bol pri použití rovnakej koncentrácie kyseliny zistený obsah 3HV v kopolymére len 6,74 mol. %. Je teda zrejmé, že evolučné inžinierstvo je nástroj, ktorý má potenciál pre zlepšenie produkčných vlastností *H. halophila*, a to nielen v zmysle navýšenia výťažku, ale tiež vylepšenia materiálových vlastností pripravených materiálov. Pre overenie reálneho biotechnologického potenciálu kmeňa B je potrebné jeho ďalšie testovanie, a to predovšetkým pri kultivácii v bioreaktore.

Ďalšie experimenty by mohli byť zamerané samostatne na uskutočnenie adaptačných experimentov. Realizáciou väčšieho množstva kultivácií po dlhší čas by mohol byť potvrdený predpoklad, že u adaptovaných kmeňov baktérií *Halomonas halophila* dochádza k tvorbe PHA s vyšším obsahom 3HV v kopolymére ako u pôvodných kmeňov baktérií. Baktérie by boli po aplikácii stresového faktoru (vd'aka adaptácii) odolnejšie voči stresu a mali by lepšie priemyselné využitie. Optimalizáciou kultivačného procesu by mohli byť dosiahnuté aj vyššie koncentrácie biomasy v g/l. Vyšší obsah 3HV v kopolymére by zmenil jeho výsledné vlastnosti a zabezpečil tak lepšie využitie v niektorých priemyselných procesoch a odvetviach (napr. zvýšenie ohybnosti kopolyméru). PHA ako prírodné polyestery by mohli nahradiť konvenčné plasty. Nepredstavovali by tak hrozbu pre životné prostredie a boli by rozkladané neenzymaticky alebo enzymaticky pomocou extracelulárnych enzýmov mikroorganizmov.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] MÚDRY, Michal. *Ecoplast from Slovakia*. Strojárstvo/Strojírenství. Žilina: MEDIA/ST, 2013, 17(4), 110-111. ISSN 1335-2938. Dostupné tiež z: <http://www.floowie.com/sk/citaj/1378047803515ad8c7e031c/#/strana/113/zvacsenie/100/>
- [2] GIRONI, Fausto a Vincenzo PIEMONTE. *Bioplastics and Petroleum-based Plastics: Strengths and Weaknesses*. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects [online]. 2011, 33(21), 1949-1959 [cit. 2018-11-11]. DOI: 10.1080/15567030903436830. ISSN 1556-7036. Dostupné tiež z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15567030903436830>
- [3] HABRMANOVÁ, Slávka. *Eko-bio plasty*. Veda na dosah: Chemické vedy [online]. Bratislava: CENTRUM VEDECKO-TECHNICKÝCH INFORMÁCIÍ SR, 2016, 24.9.2014, s. 1-6 [cit. 2018-11-10]. Dostupné tiež z: <http://vedanadosah.cvtisr.sk/eko-bio-plasty>
- [4] VONDRÁČKOVÁ, Nikola. *Resinex: Bioplasty ako významný trend súčasnosti: Plastové obaly*. PlasticPortal.eu [online]. Nitra: ICOSA, 2018, 8.11.2018 [cit. 2018-11-13]. Dostupné tiež z: <https://www.plasticportal.sk/sk/resinex-bioplasty-ako-vyznamny-trend-sucasnosti/c/5075/>
- [5] PAGE, Wiliam J., Janet MANCHAK a Brent RUDY. *Formation of Poly(Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) by Azotobacter vinelandii UWD*. Applied and enviromental mikrobiology. Department of Microbiology, University of Alberta, Canada: American Society for Microbiology, 1992, 9(58), 2866-2873. ISSN 00992240. Dostupné tiež z: <https://aem.asm.org/content/aem/58/9/2866.full.pdf>
- [6] ZHU, Zhengming, Juan ZHANG, Xiaomei JI, Zhen FANG, Zhimeng WU, Jian CHEN a Guocheng DU. *Evolutionary engineering of industrial microorganisms-strategies and applications*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2018, 102(11), 4615-4627. DOI: 10.1007/s00253-018-8937-1. ISSN 0175-7598. Dostupné tiež z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-018-8937-1>
- [7] HORVÁTOVÁ, Petra. *Priemerný Slovák použije ročne 466 plastových tašiek*. Enviroportál [online]. Banská Bystrica: Slovenská agentúra životného prostredia, 2013, 13.11.2013 [cit. 2018-11-10]. Dostupné tiež z: <https://www.enviroportal.sk/clanok/priemerny-slovak-pouzije-rocne-466-plastovych-tasiek>
- [8] TOKUYAMA, Kento, Yoshihiro TOYA, Takaaki HORINOUCI, Chikara FURUSAWA, Fumio MATSUDA a Hiroshi SHIMIZU. *Application of adaptive laboratory evolution to overcome a flux limitation in an Escherichia coli production strain*. Biotechnology and Bioengineering. 2018, 115(6), 1542-1551. DOI: 10.1002/bit.26568. ISSN 00063592. Dostupné tiež z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.26568>

- [9] DRAGOSITS, Martin a Diethard MATTANOVICH. *Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology*. Microbial Cell Factories. 2013, 12(1). DOI: 10.1186/1475-2859-12-64. ISSN 1475-2859. Dostupné tiež z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-12-64>
- [10] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1
- [11] LEE, Joo-Young, Jiyeon SEO, Eung-Soo KIM, Heung-Shick LEE a Pil KIM. *Adaptive evolution of Corynebacterium glutamicum resistant to oxidative stress and its global gene expression profiling*. Biotechnology Letters. 2013, 35(5), 709-717. DOI: 10.1007/s10529-012-1135-9. ISSN 0141-5492. Dostupné tiež z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-012-1135-9>
- [12] KODYM, Andrea a Rownak AFZA. *Physical and Chemical Mutagenesis. Plant Functional Genomics*. New Jersey: Humana Press, 2003, , 189-204. DOI: 10.1385/1-59259-413-1:189. ISBN 1-59259-413-1. Dostupné tiež z: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-413-1:189>
- [13] ZHANG, Xue, Xiao-Fei ZHANG, He-Ping LI, Li-Yan WANG, Chong ZHANG, Xin-Hui XING a Cheng-Yu BAO. *Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2014, 98(12), 5387-5396. DOI: 10.1007/s00253-014-5755-y. ISSN 0175-7598. Dostupné tiež z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-014-5755-y>
- [14] HAHN-HÄGERDAL, Bärbel, Kaisa KARHUMAA, Christer U LARSSON, Marie GORWA-GRAUSLUND, Johann GÖRGENS a Willem H VAN ZYL. *Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use*. Microbial Cell Factories. 4(1). DOI: 10.1186/1475-2859-4-31. ISSN 14752859. Dostupné tiež z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-4-31>
- [15] KOURMENTZA, Constantina, Jersson PLÁCIDO, Nikolaos VENETSANEAS, Anna BURNIOL-FIGOLS, Cristiano VARRONE, Hariklia N. GAVALA a Maria A. M. REIS. *Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production*. Bioengineering. 2017, 4(4). DOI: 10.3390/bioengineering4020055. ISSN 2306-5354. Dostupné tiež z: <http://www.mdpi.com/2306-5354/4/2/55>
- [16] MACRAE, Roderick M. a James F. WILKINSON. *Poly-B-hydroxybutyrate Metabolism in Washed Suspensions of Bacillus cereus and Bacillus megaterium*. In: J. gen. Microbiol. 19 [online]. Bareriology Department, University of Edinburgh, 1958, s. 210-222 [cit. 2018-10-27]. Dostupné tiež z: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/19/1/mic-19-1-210.pdf?expires=1540666049&id=id&accname=guest&checksum=DEB03FA5EC69F1C48BCB135F2D90E75D>

- [17] OJUMU, Tunde V., Ji YU a Bo O. SOLOMON. *Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer*. African Journal of Biotechnology. 2004, 3(1), 18-24. DOI: 10.5897/AJB2004.000-2004. ISSN 1684-5315. Dostupné tiež z: <http://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/F1BA0DF31754>
- [18] ALDOR, Ilana S. a Jay D. KEASLING. *Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates*. Current Opinion in Biotechnology. 2003, 14(5), 475-483. DOI: 10.1016/j.copbio.2003.09.002. ISSN 09581669. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166903001290>
- [19] SIMON-COLIN, Christelle, Gérard RAGUÉNÈS, Joelle COZIEN a Jean G. GUEZENNEC. *Halomonas profundus sp. nov., a new PHA-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp*. Journal of Applied Microbiology. 2008, 104(5), 1425-1432. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03667.x. ISSN 1364-5072. Dostupné tiež z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03667.x>
- [20] *What are the monomers and structure of PHBV?*. Zigya.com [online]. [cit. 2018-11-23]. Dostupné tiež z: https://www.zigya.com/study/book?class=12&board=cbse&subject=Chemistry&book=Chemistry+II&chapter=Polymers&q_type=&q_topic=Molecular+Mass+of+Polymers&q_category=&question_id=CHEN12075352
- [21] LEE, Sang Yup. *Bacterial polyhydroxyalkanoates*. Biotechnology and bioengineering. 1996, 49(1), 1-14. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P. Dostupné tiež z: [https://doi-org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960105\)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P](https://doi-org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P)
- [22] BĚHÁLEK, Luboš. *Přechodové teploty polymerů*: Polymery. Publi.cz [online]. 2014, 30.9.2014 [cit. 2018-11-23]. Dostupné tiež z: <https://publi.cz/books/180/06.html>
- [23] BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, Karl FORCHHAMMER, Daniel PFEIFFER a Dieter JENDROSSEK. *Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids*. Scientific Reports. 2016, 6(1). DOI: 10.1038/srep26612. ISSN 2045-2322. Dostupné tiež z: <http://www.nature.com/articles/srep26612>
- [24] FLICKINGER, Michael C. a Stephen W. DREW. *The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: Wiley, 1999. ISBN 978-0471138228.
- [25] ZOU, Huibin, Mengxun SHI, Tongtong ZHANG, Lei LI, Liangzhi LI a Mo XIAN. *Natural and engineered polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: key enzyme in biopolyester production*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2017, 101(20), 7417-7426. DOI: 10.1007/s00253-017-8485-0. ISSN 0175-7598. Dostupné tiež z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-017-8485-0>

- [26] ZAPLETAL, Martin a Jiří TREJBAL. *Izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy*. Chem. listy 110 [online]. Ústav organické technologie, Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, 2016, , 860-867 [cit. 2018-10-27]. Dostupné tiež z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2016_12_860-867.pdf
- [27] SUDESH, Kumar, Hideki ABE a Yoshiharu DOI. *Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters*. Progress in Polymer Science. 2000, 25(10), 1503-1555. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [28] OBRUČA, Stanislav. *Valorizace odpadů potravinářského průmyslu* [online]. Brno: VUTIUUM, 2015, s. 13-19 [cit. 2019-03-13]. ISBN 978-80-214-5200-8. Dostupné tiež z: <http://www.vutium.vutbr.cz/tituly/pdf/ukazka/978-80-214-5200-8.pdf>
- [29] KOLLER, Martin, Lukáš MARŠÁLEK, Miguel Miranda DE SOUSA DIAS a Gerhart BRAUNEGG. *Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner*. New Biotechnology. 2017, 37, 24-38. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.05.001. ISSN 18716784. Dostupné tiež z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678416300115>
- [30] IVANOV, Volodymyr, Viktor STABNIKOV, Zubair AHMED, Sam DOBRENKO. *Production and applications of crude polyhydroxyalkanoate-containing bioplastic from the organic fraction of municipal solid waste* [online]. [cit. 2018-11-09]. DOI: 10.1007/s13762-014-0505-3. ISBN 10.1007/s13762-014-0505-3. Dostupné tiež z: <http://link.springer.com/10.1007/s13762-014-0505-3>
- [31] QUESADA, Emilia, Antonio VENTOSA, Francisco RUIZ-BERRAQUERO a Alberto RAMOS-CORMENZANA. *Deleya halophila, a New Species of Moderately Halophilic Bacteria*. International Journal of Systematic Bacteriology. 1984, 34(3), 287-292. DOI: 10.1099/00207713-34-3-287. ISSN 0020-7713. Dostupné tiež z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-34-3-287>
- [32] OBRUČA, Stanislav, Petr SEDLÁČEK, Martin KOLLER, Dan KUČERA a Iva PERNICOVÁ. *Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications*. Biotechnology Advances. 2018, 36(3), 856-870. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.006. ISSN 07349750. Dostupné tiež z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975017301581>
- [33] VAN DEN BURG, Bertus. *Extremophiles as a source for novel enzymes*. Current Opinion in Microbiology. 2003, 6(3), 213-218. DOI: 10.1016/S1369-5274(03)00060-2. ISSN 13695274. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527403000602>
- [34] KUČERA, Dan, Iva PERNICOVÁ, Adriána KOVALČÍK, Martin KOLLER, Lucie MÜLLEROVÁ, Petr SEDLÁČEK, Filip MRAVEC, Jana NEBESÁŘOVÁ, Michal KALINA, Ivana MÁROVÁ, Vladislav KRZYZANEK, Stanislav OBRUČA. *Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium Halomonas halophila*. Bioresource Technology. 2018, 256, 552-556. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.02.062. ISSN 09608524. Dostupné tiež z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852418302554>

- [35] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. *Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2007, 82(3), 233-247. DOI: 10.1002/jctb.1667. ISSN 02682575. Dostupné tiež z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1667>
- [36] DEVÁNOVÁ, Andrea. *Prof. Pavel Alexy: Rozložiteľné bioplasty majú budúcnosť aj v medicíne*. Veda na dosah: Chemické inžinierstvo [online]. Bratislava: CENTRUM VEDECKO-TECHNICKÝCH INFORMÁCIÍ SR, 2016, 25.6.2018, s. 1-3 [cit. 2018-11-10]. Dostupné tiež z: <http://vedanadosah.cvtisr.sk/prof-pavel-alexey-rozlozitelne-bioplasty-maju-buducnost-aj-v-medicine>
- [37] DEBNÁR, Ján. *Slovenskí vedci pracujú na okuliaroch aj nábytku z nových bioplastov*. Aktuality.sk: Veda [online]. 31.5.2018 [cit. 2018-11-10]. Dostupné tiež z: <https://www.aktuality.sk/clanok/594341/slovenski-vedci-pracuju-na-okuliaroch-aj-nabytku-z-novych-bioplastov/>
- [38] WITHOLT, Bernard a Birgit KESSLER. *Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics*. DOI: 10.1016/S0958-1669(99)80049-4. ISBN 0958-1669. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166999800494>
- [39] MAJERNÍK, Ján a Jana GORKOVÁ. *Determinacia vplyvu recyklácie a regranulácie termoplastov*. Posterus: Strojárstvo [online]. Bratislava: Systémy priemyselnej informatiky, 2014, 21.07.2014, 7(7), 1-6 [cit. 2018-11-10]. ISSN 1338-0087. Dostupné tiež z: <http://www.posterus.sk/?p=17215&output=pdf>
- [40] CHOI, Gang Guk, Hyung Woo KIM a Young Ha RHEE. *Enzymatic and Non-enzymatic Degradation of Poly (3-Hydroxybutyrate-co3-Hydroxyvalerate) Copolyesters Produced by Alcaligenes sp. MT-16*. The Journal of Microbiology [online]. Korea: The Microbiological Society of Korea, 2014, 42(4), 1-8 [cit. 2018-11-11]. Dostupné tiež z: http://www.msk.or.kr/jsp/view_old_journalD.asp?THEIDX=2100
- [41] NUMATA, Keiji, Hideki ABE a Tadahisa IWATA. *Biodegradability of Poly(hydroxyalkanoate) Materials*. Materials. 2009, 2(3), 1104-1126. DOI: 10.3390/ma2031104. ISSN 1996-1944. Dostupné tiež z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/2/3/1104>
- [42] KOLOMAZNÍK, Vít. *Příprava a charakterizace kopolymerů na bázi poly-3-hydroxybutyrátu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 54 s. Vedúci bakalárskej práce: Ing. Tomáš Porubský. Dostupné tiež z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=146366

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

3HB – 3-hydroxybutyrát

3HV – 3-hydroxyvalerát

HDPE – vysokohustotný polyetylén

LPDE – nízko hustotný polyetylén

P(3HB-*co*-3HV) – poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát)

PA 6 – polyamid 6

PA 66 – polyamid 66

PBT – polybutyléntereftalát

PEEK – polyaryléterketón

PET – polyetyléntereftalát

PHA – polyhydroxyalkanoáty

POM – polyoxymetylén

PP – polypropylén

PTFE – polytetrafluóretylén

8 PRÍLOHY

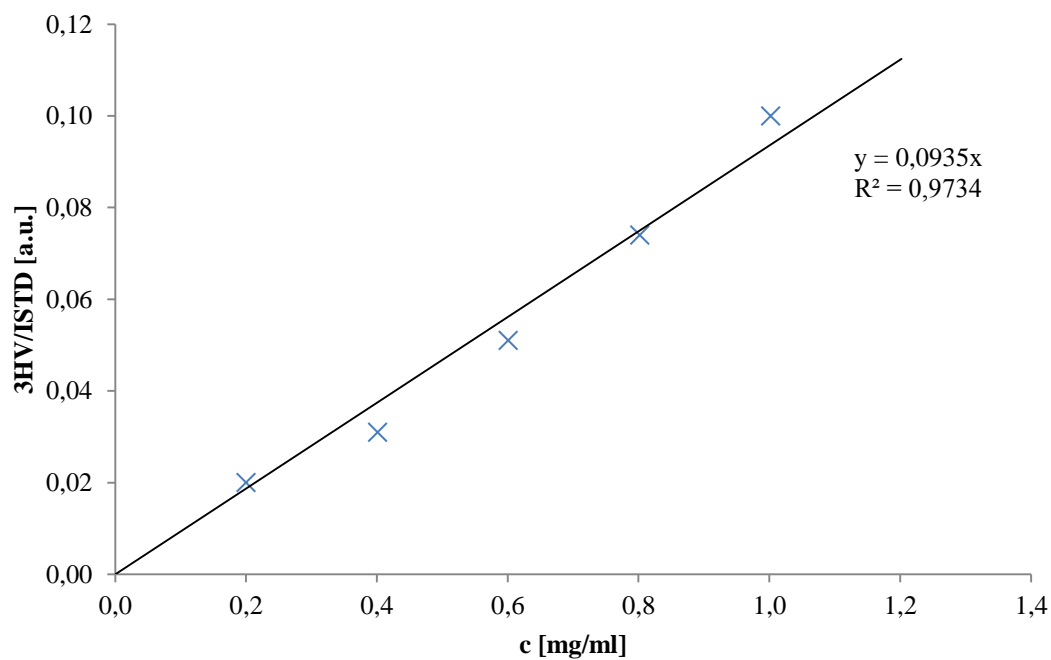
8.1 Kalibrácia metódy pre stanovenie jednotlivých monomérov v kopolymére

Biomasa z jednotlivých vzoriek bola analyzovaná na plynovom chromatografe s FID detekciou na obsah PHA a zastúpenie jednotlivých monomérov v kopolymére. Kalibračná závislosť pre obsah 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu v kopolymére bola zostavená na základe analýzy štandardu kopolyméru (postup vid'. kapitola 3.6.1). Pre stanovenie obsahu monomérov v kopolymére boli použité rovnice regresie prislúchajúce kalibračnej krivke zo závislosti pomeru plôch píkov jednotlivého monoméru (3HB alebo 3HV) k internému štandardu – kyseline benzoovej (ISTD) na koncentrácii daného monoméru (3HB alebo 3HV). Namerané hodnoty pomeru plôch píkov a prislúchajúce koncentrácie sú uvedené vid'.

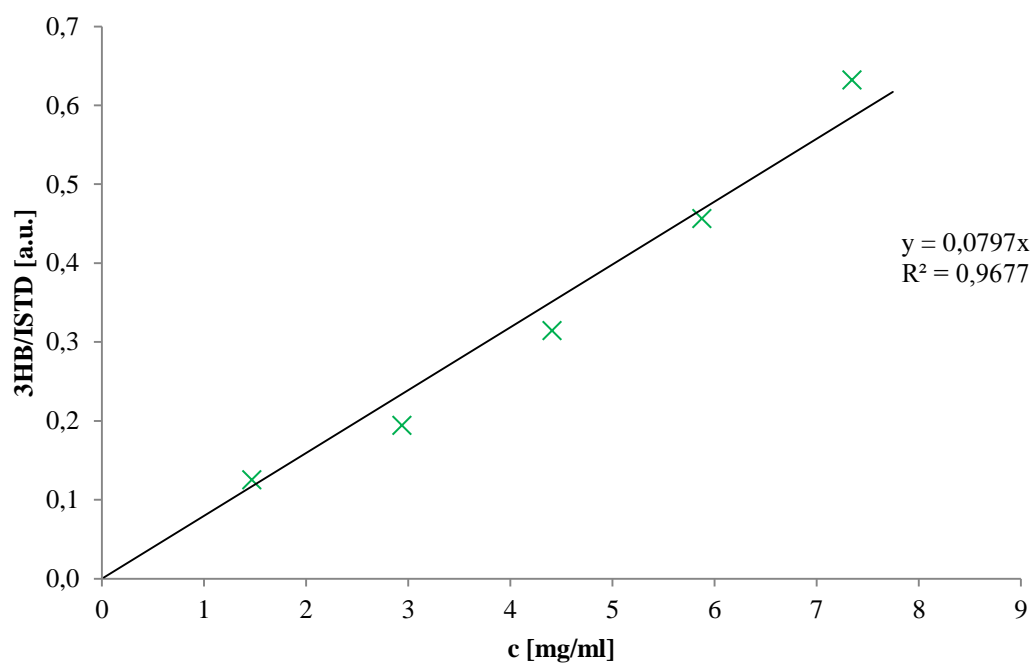
. Kalibračná závislosť pre výpočet obsahu 3HV v biomase je daná rovnicou regresie $3HV/ISTD = 0,0935 \cdot c_{3HV}$ s indexom korelácie $R^2 = 0,9734$. Pre výpočet obsahu 3HB v biomase je kalibračná závislosť určená rovnicou regresie $3HB/ISTD = 0,0797 \cdot c_{3HB}$ s indexom korelácie $R^2 = 0,9677$.

Tab. 15 Namerané hodnoty pomeru plôch píkov a prislúchajúce koncentrácie

3HV/ISTD [a.u.]	c [mg/ml]	3HB/ISTD [a.u.]	c [mg/ml]
0,020	0,200	0,125	1,470
0,031	0,401	0,194	2,939
0,051	0,601	0,314	4,409
0,074	0,802	0,456	5,878
0,100	1,002	0,632	7,348



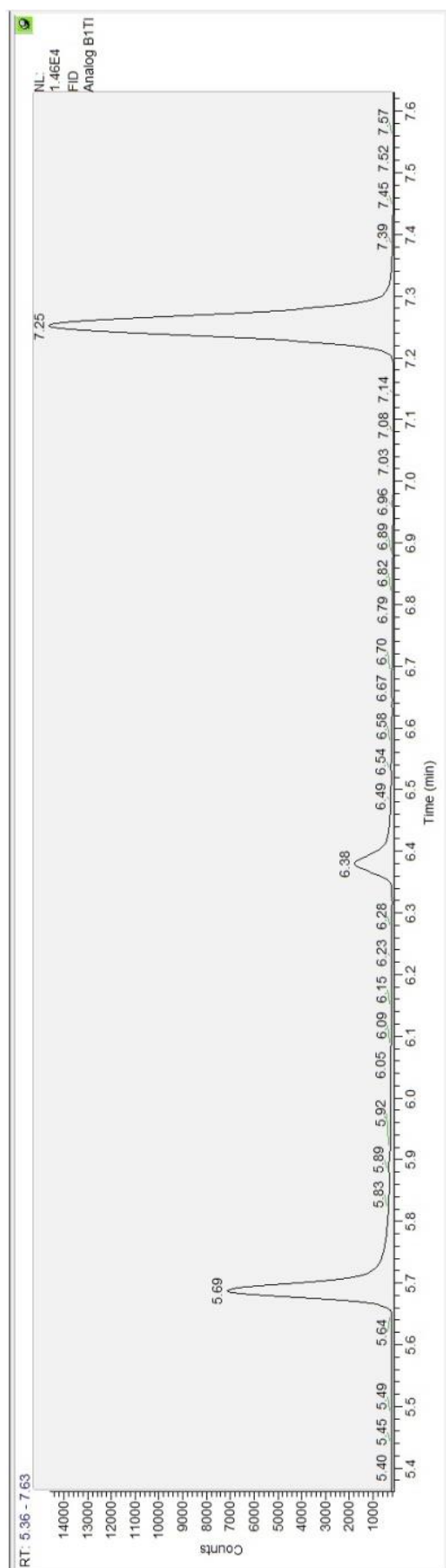
Graf 4 Kalibračná závislosť pomeru plôch pík 3-hydroxyvalerátu k internému štandardu na koncentrácii 3HV



Graf 5 Kalibračná závislosť pomeru plôch pík 3-hydroxybutyrátu k internému štandardu na koncentrácii 3HB

8.2 Analýza biomasy na plynovom chromatografe s FID detekciou

Analýzou biomasy na plynovom chromatografe s FID detekciou boli získané chromatogramy pre jednotlivé vzorky. Chromatogram zaznamenáva závislosť odozvy (signálu) detektoru na retenčnom čase. Retenčný čas je doba, ktorá uplynie od nadávkovania vzorku až po objavenie sa píku na chromatograme. Čas v ktorom sa získa maximum píku danej látky charakterizuje látku kvalitatívne. Na chromatograme (vid'. Obr. 14) možno vidieť peaky pre 3HB (1. peak, najkratší retenčný čas bol 5,69 min.), 3HV (2. pík, retenčný čas bol 6,36 min.) a interný štandard kyselinu benzoovú (3. pík, retenčný čas = 7,25 min.). Plocha píku súvisí s kvantitou danej látky. Väčšie množstvo látky v danom čase poskytuje väčší signál. Najväčší signál bol dosiahnutý pri internom štandarde a najmenší pri 3HV, ktorý je v kopolymére P(3HB-co-3HV) v menšom zastúpení ako 3HB, ktorého signál dosahuje samozrejme vyššiu hodnotu.



Obr. 15 Chromatogram pre vzorku B z kultivácie popísanej v kapitole 3.4.2